

2020 – YLEISTAJUISET TIIVISTELMÄT JA TAKAUTUVAT ARVIOINNIT TUTKIMUS-HANKKEISTA, JOISTA LAUTAKUNTA ON MÄÄRÄNNYT TAKAUTUVAN ARVIOINNIN TEHTÄVÄKSI HANKKEEN PÄÄTYTTYÄ.

Hankkeet on hyväksytty vuosina 2015 – 2017. Hanke voi saada voimassaolon jatkoluvan perusteluista syistä, jolloin takautuva arviointi siirtyy jatkoluvan päättymisen ajankohtaan.

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Syntymänaikaisen asfyksian perusmekanismit ja vaikutukset	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	asfyksia, aivojen kehittyminen, hermoverkkoaktiivisuus, hermosolujen ärtyvyys, varhaiskehitys	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Asfyksia, eli riittämätön hapensaanti synnytyksen aikana, on etenevä tilanne, jossa sikiön veren happipitoisuus pienenee, hiilidioksiditaso nousee ja aivojen pH laskee. Lievä, lyhytaikainen asfyksia on luonnollinen osa syntymää, ja näyttää jopa suo- jaavan vauvan aivoja synnytyksen aikana.</p> <p>Jos synnytys on vaikea ja hapensaanti estyy pidemmäksi ajaksi, vakava asfyksia saattaa kuitenkin johtaa epileptisiin kohtauksiin ja aiheuttaa häiriötä aivojen kehityksessä. Väestötasolla epilep- tisten kohtausten esiintyvyys on korkeimmillaan varhaislapsuu- dessa, eivätkä nykyiset antikonvulsantit tarjoa riittävästi apua tässä ikävaiheessa.</p> <p>Aivojen hermoverkkojen toiminnassa on eläinkokeissa havaittu poikkeavuuksia 24 tuntia asfyksiakäsittelyn jälkeen, mutta myös että asfyksiasta normaaliin hengitysilmaan palaaminen porrastetusti palauttaa hermoston toiminnan normaalinkal- taiseksi. Asfyksian aikana aivoissa erittyy AVP-nimistä hormo- nia, jolla on aivojen pH:ta sääteleviä vaikutuksia ja joka saattaa vaikuttaa asfyksian aikaisiin hermostollisiin vaurioihin.</p> <p>Hankkeen tavoitteena on tutkia miten hermoston toiminta muuttuu asfyksian aikana ja minkälaisia muutoksia toiminnassa on pitkällä aikavälillä. Lisäksi selvitetään, minkälaisia solutason</p>	

	<p>muutoksia aivoissa tapahtuu ja kuinka nämä muutokset osaltaan aiheuttavat vakavaan asfyksiaan liittyvät hermoston toimintahäiriöt.</p> <p>Tutkimuksessa selvittää myös mikä rooli ja diagnostinen arvo AVP:llä ja muilla verestä mitattavilla merkkiaineilla on asfyksian seurauksissa ja näiden vakavuuden ennustamisessa.</p>
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	<p>Asfyksia voi vakavammissa tapauksissa johtaa tajuttomuuteen ja kouristuksiin, joiden seurauksena voi syntyä hermostollisia vaurioita ja häiriöitä aivojen kehityksessä.</p> <p>Tutkimuksen tavoitteena on asfyksian taustamekanismeja selvittämällä löytää uusia keinoja tunnistaa asfyksian vakavuus ja ennaltaehkäistä ja hoitaa näitä asfyksian aiheuttamia varhaisen epileptisiä kohtauksia ja muita komplikaatioita.</p>
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta 1880, hiiri, 390 eläintä.
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	<p>Asfyksian indusointi ja sen aikainen pennun eristäminen emosta aiheuttavat akuutisti stressiä eläimelle sekä neurologisia muutoksia. Välittömästi asfyksian jälkeen osalle eläimistä kehittyy lieviä epileptisiä kouristuksia. Invasiivisiin mittauksiin vaaditut kirurgiset toimenpiteet tehdään anestesiassa, ja itse mittaukset kivunlievityksellä tai anestesiassa.</p> <p>Toimenpiteiden päätyttyä eläimet lopetetaan.</p> <p>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</p>
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Syntymänaikainen asfyksia on systeeminen tila, jonka akuutit vaikutukset ulottuvat useisiin elinjärjestelmiin. Pitkäkestoisten neurologisten muutosten ja niiden seurausten kannalta keskeistä on vaurioiden distribuutio aivoissa. Näitä vaikutuksia ei kyetä jäljittelemään soluviljelmissä tai aivoleikkeissä.
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Huolellisella koesuunnittelulla ja hypoteesin asettelulla voidaan ratkaisevasti vähentää käytettyjen eläinten määrää.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	<p>a) Rottia ei voida korvata alemmilla selkärankaisilla, koska niiden keskushermoston rakenne poikkeaa niin paljon ihmisen keskushermostosta.</p> <p>b) Käytämme hankkeessa hypoksia-hyperkapnia (asfyksia) -mallia, joka jäljittelee syntymänaikaista asfyksiaa.</p> <p>c) Eläimille aiheutettu haitta minimoidaan kirurgisten toimenpiteiden yhteydessä anestesian ja kivunlievityksen avulla. Koekiden kesto pidetään mahdollisimman lyhyenä.</p>
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 17.2.2020. Arviointi E.Kaliste 7.6.2020: OK

Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli löytää uusia keinoja ennaltaehkäistä ja hoitaa syntymäasfyksian aiheuttamia komplikaatioita ihmisillä. Lähestyimme tavoitetta tutkimalla asfyksian aiheuttamia akuutteja ja kroonisia muutoksia hermosolujen ärtyvyydessä ja hermoverkkojen aktiivisuudessa pieneläimillä. Olimme erityisen kiinnostuneita siitä, millainen vaikutus arginiini-vasopressiinillä (AVP) on näihin muutoksiin.

Otimme hankkeen aikana useita edistysaskeleita tavoitteemme suuntaan:

i. Osoitimme, että AVP:ta erittyy sentraalisesti asfyksian aikana. AVP hiljentää verkkoaktiivisuuden hippokampuksessa vaikuttamalla suoraan inhibitorisiin interneuroneihin ja suojelee näin aivoja akuutin energiavajeen aikana.

ii. Kehitimme rottamallin, joka täyttää syntymäasfyksian tärkeimmät kliiniset kriteerit ja jäljittelee syntymäasfyksiaa myös asfyksian jälkeen havaittavien kouristuskohtausten osalta. Mallimme on tutkimusalan kehityksen kannalta merkittävä, sillä varsinaista syntymäasfyksiamallia ei pienillä nisäkkäille toistaiseksi ole ollut (tyypillisesti on käytetty hypoksia- ja aivoinfarktimalleja).

iii. Asfyksiakouristuksiin ja muihin neonaattien kouristuskohtauksiin ei toistaiseksi ole täsmälääkettä. Niitä hoidetaan aikuisille kehitetyillä epilepsialääkkeillä, joiden teho on heikko ja sivuvaikutukset vakavia. Osoitimme, että asfyksian rottamallissa havaittavat kouristukset voidaan ennaltaehkäistä hidastamalla aivojen pH:n palautumista hiilidioksidilla tai karboanhydraasi-inhibiittorilla. Aivojen pH:n säätely edustaa uudenlaista terapeutista strategiaa, jolla neonaattien kouristuksia voitaisiin ehkäistä/hoitaa.

iv. Puhtaan fysiologisen tutkimuksen saralla olemme kattavasti karakterisoineet kokeellisen asfyksian vaikutukset aivojen ja muun elimistön pH:hon ja hapen osapaineeseen kuuden ja 11 päivän ikäisillä rotilla sekä 0-2 päivän ikäisillä marsuilla. Tuloksemme osoittavat, että postnataalit rotat reagoivat kvalitatiivisesti samankaltaisesti asfyksiaan kuin prenataalit lampaat ja porsaas, joita pidetään systeemitason asfyksiatutkimukseen parhaiten soveltuvina malleina. Näin ollen, osa suurilla eläimillä suoritettavista asfyksiatutkimuksista voitaisiin tehdä rotilla.

2. Millaista haittaa?

Valtaosa (>95 % kokeista) hankkeen toteutuneista kokeista on terminaalianestesiassa (SV1) rotilla suoritettuja pH- ja EEG-mittauksia tai vapaasti liikkuvilla rotilla tehtyjä käyttäytymiskokeita, joiden aikana eläin altistettiin asfyksialle (matala O₂, korkea CO₂), hypoksialle (matala O₂, normaali CO₂) tai hyperkapnialle (normaali O₂, korkea CO₂). Käyttäytymiskokeiden haitta-asteeksi on hankeluvassa arvioitu SV3. Tosiallinen haitta vastasi arviota mielestämme hyvin. Kaasukäsittelyt aiheuttivat eläimille lyhytaikaista stressiä, joka ilmeni pakokäyttäytymisenä. Käsittelyistä erilaiset asfyksiaparadigmat olivat selvästi käytetyimpiä (> 80 % kokeista) ja niiden aikana rotat olivat ensimmäinuitteja lukuun ottamatta tajuttomuutta vastaavassa tilassa. Asfyksialle altistetuista eläimistä osa sai lyhytaikaisen (<3 min) kouristuskohtauksen asfyksian jälkeen. Kouristukset eivät kuitenkaan

uusiutuneet, eikä niillä ollut lyhyen (10-20 min), kouristuksista toipumiseen kuluneen ajan jälkeen vaikutusta rottien käytökseen kokeiden kestoaikana (tyypillisesti 90 min asfyksian jälkeen. Muutamia eläimiä seurattiin 24 h).

LOPETUSKRITEERIT

Suurin osa kokeista olivat akuutteja: ne kestivät alle 4 h ja eläimet lopetettiin kokeen päätyttyä. Lyhyestä kestoista johtuen lopetuskriteereiden mukaisia lopetuksia ei akuuteissa kokeissa jouduttu tekemään. Käytimme 50-60 eläintä kokeisiin, joissa mittasimme EEG:tä vapaasti liikkuvista rotanpoikasista. EEG-elektrodit oli asetettu kirurgisesti paikalleen kalloon 24 h ennen mittausta. Näissä kokeissa n. 20 % poikasista jouduttiin lopettamaan ennen mittausta, koska emo ei hyväksynyt leikkattua poikasta. Poikkeukset näissä tilanteissa emo yritti lähes välittömästi poikasen palautuksen jälkeen irrottaa elektrodihatun poikasen päästä. Tällöin kokeen tekijä poisti poikasen häkistä viipymättä ja lopetti sen. Emon reaktio poikaseen oli luettavissa emon käytöksestä palautushetkeä seuranneen 5 minuutin aikana 100 % tarkkuudella ja emot hoitivat kaikki kotihäkkiin jätetyt poikaset. Näin ollen poikasten hyvinvoinnin seurantaan käyttämämme strategia (tarkastus 0, 2 ja 24 h leikkauksen jälkeen) toimi hyvin.

VAKAVAN HAITTALUOKAN KOKEET

Takautuvan arvioinnin perusteena olevia kokeita, joissa hereillä oleva rotanpoikanen immobilisoidaan päästään ja altistetaan asfyksialla samalla kun sen aivosähkökäyrää mitataan, ei tehty kokonaisuudessaan yhdellekään rotalla. Teimme yhden kokeen, jossa tätä koesuunnitelmaa mukailtiin muilta osin, paitsi että rottaa ei altistettu asfyksialle. Kokeessa rotanpoikanen immobilisoitiin heti EEG-mittaukseen vaadittavan leikkauksen jälkeen, ennen kuin se oli täysin herännyt anestesiasta. Anestesian vaikutuksen hälventyessä rotta alkoi liikkua ja äänellä stressaantuneena, jolloin koe päätettiin. Siirryimme tämän jälkeen tekemään kokeet uretaanianestesiassa.

Vuoden 2015 eläinkäyttöraportissa ilmoitimme tämän luvan ESAVI/6135 alla käyttäneemme 55 rottaa SV4-haittaluokan kokeissa. Yllämainittua koetta lukuun ottamatta, näiden rottien haittaluokittelu on kuitenkin tehty virheellisesti. Rotat käytettiin ”akuutteihin pH-mittauksiin asfyksian aikana osittain ilman anestesiaa” (osahanke 2, toimenpide 3b) ja niiden haitta-aste on tosiasiasa korkeintaan kohtalainen. Näiden kokeiden aikana rotat pidettiin isofluraanianestesiassa perustamittauksen ajan ja asfyksian jälkeen, mutta anestesia lopetettiin asfyksian ajaksi, jotta kuolleisuutta voitiin vähentää. Immobilisaatiosta huolimatta rotat osoittivat asfyksian aikana jopa vähemmän stressin merkkejä kuin vapaasti liikkuvat eläimet. Tämä johtui luultavasti siitä, että jäänösanestesia vaimensi asfyksian ensimmäisiin 2-3 minuuttiin liittyvän stressivasteen. Tämän jälkeen rotat ovat tajunnan menetystä muistuttavassa tilassa asfyksian loppuun saakka. Korvasimme näiden kokeiden jälkeen isofluraanin uretaanilla, mikä mahdollisti anestesian käyttämisen myös asfyksian aikana pH- ja EEG-mittauksissa.

3. 3R-mahdollisuudet

Asfyksian eläinmalleja ei toistaiseksi voida korvata esimerkiksi organoideilla tai soluilla. Asfyksia muuttaa dramaattisesti hengitystä, verenkiertoa ja aivojen toimintaa. Asfyksian aiheuttama aivo-aurio syntyy näiden muutosten yhteisvaikutuksena, jonka mallintaminen yksinkertaistetussa järjestelmässä ei ole mahdollista. Osaa eläimen asfyksiavasteesta voidaan jäljitellä eristetyssä kudoksessa ja olemmekin yrittäneet kehittää aivoleikemallin asfyksian ja sitä seuraavien kouristusten aiheuttamien molekulaaristen aivomuutosten tutkimiseen. Neonaattikudoksen käyttö tähän

tarkoitukseen osoittautui kuitenkin erittäin hankalaksi ja joudumme toistaiseksi tekemään vastaavat kokeet **in vivo** (terminaalianestesiassa).

Käytimme hankkeen aikana pääasiassa eläinmalleja, joiden käytöstä oli kirjallisuudessa niukasti tietoa. Opimme miten malli toimii eri-ikäisillä rotilla ja minkälaista asfyksiaprotokollaa kannattaa käyttää asfyksiakouristusten ja niiden hoitojen tutkimiseen. Hyvin toimivat ja validoidut menetelmät mahdollistavat eläinmäärien vähentämisen sekä eläinten hyvinvoinnin parantamisen tulevissa tutkimuksissa niin meidän laboratoriossa kuin muissakin asfyksiatutkimuksiin keskittyvissä tutkimusryhmissä.

Hankkeen kokeet olivat pääasiassa lyhytkestoisia ja niiden lyhentäminen entisestään ei ole mahdollista. Rekisteröimme jo nyt monissa mittauksissa useita fysiologisia parametreja (pH, PO_2 , EEG, sisälämpötila, syke ym.) samanaikaisesti, mutta erityisesti kudoksenäytteiden hyödyntämisessä olisi parantamista. Mietimme jatkossa, miten molekyylibiologiset analyysit voitaisiin suorittaa vähemmillä eläinmäärillä.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahankkeet 1-3	rotta		848/1087	SV1=terminaalianestesia	-	-
	rotta		436/69	SV2=lievä	Injektio ja/tai erotus emosta	-
	rotta		988/624	SV3=kohtalainen	Asfyksia/hypoksia altistus, lyhytkestoinen (<3 min) kouristuskohtaus	-
	rotta		66/1	SV4=vakava	Kirurgia (buprenorfiini analgesia), pitkäkestoinen immobilisaatio ja asfyksia/hypoksia altistus	-
Osahankkeet 1-3	hiiri		390/32	SV1	-	-
	hiiri		30/43	SV2	-	-
	hiiri		1150/93	SV3	Asfyksia/hypoksia altistus, lyhytkestoinen (<3 min) kouristuskohtaus	-
	hiiri		0/0	SV4	-	-
Osahankkeet 1-3	marsu		83/5	SV1	-	-

Huom EK 7.6.2020: Muutosluvulla on eläinmääriä lisätty yhteensä 458 rottaa, 83 marsua, 1180 hiirtä.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Asfyksiaprotokollan valinta	x	x	x	x
Rotanpoikasten hyvinvointi kirurgisten toimenpiteiden jälkeen	x	x	x	x
Asfyksiaprotokollan kesto	x	x	x	x

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen multippleliskeroosin (MS) ja amyotrofisen lateraaliskleroosin (ALS) prekliinisissä tautimalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Lääkeainetestaus, prekliininen	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	ALS:n ja MS:n hoitoon ei ole tällä hetkellä käytössä tehokkaita, sivuvaikutuksettomia hoitomuotoja. Prekliinisten eläinkokeiden tarkoituksena on edesauttaa mahdollisen ihmiskäyttöön soveltuvan lääkeaineen löytymistä ja sitä kautta helpottaa yksilön hyvinvointia ja tuoda yhteiskunnallista hyötyä.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Eläinkokeet ovat välttämättömiä uusien lääkeaineiden kehitystyössä. Mahdolliset positiiviset tulokset edesauttavat tutkittavan lääkeaineen etenemistä lääkekehitystyössä mahdollisesti kliinisiin kokeisiin ja myöhemmin valmiiksi lääkkeeksi. Tutkimukset tuovat merkityksellistä tietoa lääkeaineiden tehosta ALS- ja MS-tautien monimuotoisen oireiston hoidossa.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri, 8550; Rotta, 5400 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa tautilan indusoinnissa tehtävistä käsittelyistä, ml kirurgiset operaatiot. Tautitila kehittyy eläimissä taudin indusoinnin tai geneettisen taustan seurauksena. Tautitilat etenevät progressiivisesti eli kyseiset oireet ja patologia voimistuvat iän mukana. Haittaa aiheutuu seuranta-aikana myös käyttäytymistesteistä, lääkinnästä ja kuvantamisesta. Eläimet lopetetaan tutkimusten loputtua. Vakavuusluokat: vakava	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	In vitro -mallit ovat hyvin rajalliset johtuen koko eliön elimistön fysiologisten ja anatomisten ulottuvuuksien puuttumisesta mallinnettaessa kutakin sairautta in vitro olosuhteissa. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvallisuutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa ennen kliinisiä kokeita, tällä hetkellä mikään in vitro tai in silico lähestymistapa ei pysty ennustamaan lääkeaineen tehoa ja/tai turvallisuutta. In vitro ja in silico mallit tukevat ja voivat auttaa koe-eläin tutkimusten suunnittelussa ja ennustamisessa.	

<p>2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</p>	<p>Koeasetelmat on standardoituja ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Kunkin geneettisen mallin taustalla on ihmissairautta oleellisin osin mallintava eläinmallin ilmiä, jonka tulee olla sekä perinnöllisesti relevantti että oireistoltaan/patologialtaan ihmissairautta kuvaava. Näin varmistetaan, että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen taudinkuvan.</p> <p>Koeasetelmissa ryhmän sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi) ja joka määrittää koe-eläinten käytön määrän kussakin koeasetelmassa. Validaatiotyön ja tilastollisen voima-analyysin perusteella voidaan luotettavasti ennustaa soveltuvat ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten käytön alimpaan mahdolliseen ilman että koeasetelman tilastollinen voima vaarantuu.</p>
<p>3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</p>	<p>Suuri osa keskushermostollisten kehityssairauksien eläinmalleista on kehitetty jyrsijöissä. Jyrsijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille lääkkeille (jos on) ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät.</p> <p>Alemmilla selkärankaisilla tai in vitro -menetelmin ei voida saada samanlaista tietoa uusien lääkeaineiden tehosta, koska kyseiset menetelmät eivät ole riittävästi tutkittuja, eivätkä yleisesti hyväksytyjä ja käytettyjä. Tämän lisäksi näistä menetelmistä ei ole saatavissa tietoa tällä hetkellä käytettyjen lääkeaineiden vasteista, joita voitaisiin käyttää verrattaessa uusista lääkeaineista saatavia tuloksia. Eläimille suoritetaan vain tutkimuksen kannalta välttämättömät toimenpiteet. Kirurgiset toimenpiteiden yhteydessä eläimille annostellaan kipulääkkeitä. Eläimille on tarjolla pehmenettyä ruokaa ja niitä nesteytetään tarvittaessa. Eläimet lopetetaan heti lopetuskriteerien täytyessä.</p>
<p>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</p>	<p>KYLLÄ</p>

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 7.1.2021. Arviointi E.Kaliste 8.1.2021: OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja ALS:n ja MS:n taudin hoitoon testaamalla lääkeaineiden tehoa näiden eläinmalleissa. Tutkimuksen tarkoituksena oli testata uusia lääkeaineita, jotka mahdollisesti estävät ALS:n taudin kehittymistä ja lieventävät siihen liittyviä funktionaalisia häiriöitä ja patologisia muutoksia ja lisäävät elinaikaa. MS:n osalta tavoitteet ovat samat, erityisesti toiminnallisuuden ja oireiston vähentäminen sairauden aikana ja sivuvaikutusprofiilien väheneminen. Hanke koostui useammasta eri osahankkeesta.

OSAHANKE 1 – SOD1 (G93A mutaatio) transgeeninen malli (ALS). Klassinen ALS:n prekliininen tautimalli on geneettisesti muunneltu hiirikanta (mutatoitu SOD1 entsyymin geeni), jolle kehittyy ikääntyessä progressiivisesti etenevä neurologinen tila, joka muistuttaa ihmisellä havaittavaa ALS:a. Hiirten taudin kuva on progressiivinen ulkoisesti havaittavat liikehermosolujen rappeutumisesta johtuvat oireet alkavat tyypillisesti 90-105 päivän iässä ja etenevät vakavammaksi iän myötä. Tyypillisissä koeasetelmissä ALS-hiirille aloitetaan lääkehoito joko ennen taudin ensimmäisten oireiden puhkeamista tai samanaikaisesti, kun oireet on havaittu. Seurantajakson aikana eläimille annosteltiin tutkimuslääkkeitä, eläimiltä otettiin verinäytteitä, eläimille suoritettiin MRI/SPECT/PET-mittauksia ja käyttäytymistestejä. Hiirillä havaittiin etenevä lihassmassan vähentyminen takaraajoista, raajojen toiminnan heikentymistä, osittaista ja lopulta täydellistä takaraajojen halvaantumista. Malliin kuuluvia oireita mitataan pisteytysjärjestelmällä, joka kuului yhtenä osana lopetuskriteereihin. Eläimiä seurattiin maksimissaan 170 pv elleivät esitetyt lopetuskriteerit täyttyneet ennen sitä. Useimmat kokeet kestivät kuitenkin maksimissaan 150 tai 120 päivää, sillä testattavan lääkkeen tehosta saatiin riittävästi tietoa jo aikaisemmassa lopetuspisteessä. Malli toimii hyvin ja niistä saatavat tulokset olivat vertailukelpoisia.

OSAHANKE 2 – C9ORF72 adenoassosiaatiovirus välitteinen ALS:n malli. AAV- (C9ORF72) välitteisesti indusoidussa hiirimallissa (Chew et al. 2015 mukaan) lääkeaineiden tehon testaaminen tapahtuisi amyotrofisen lateraaliskleroosin (ALS) kaltaisen sairauden mallissa. Hiiren/rotan poikasten lateraaliventrikkeleihin infusoidun adenoassosioidun viruksen aikaansaama hermosolujen transfektio johtaisi kuukausien kuluessa kliinisesti merkittävällä tavalla patologiseen tilaan niin motorisen suoriutumisen osalta kuin myös kudostasolla (mm. TDP-43 proteiinin ekspressio). Seurantajaksot voivat olla SOD1-malliin verrattuna huomattavasti pidempiä, aina 12 kk:n saakka indusoimisesta johtuen mallin hitaammasta ja lievemmästä oireistosta. Mallia ei kuitenkaan saatu toimimaan ja osahankkeen alla suoritettiin vain yksi koe.

OSAHANKE 3 – MOG/PLP indusoidut MS:n prekliiniset tautimallit. MS-taudin kokeellinen muoto autoimmuuni-enkefalomyeliitti (EAE) indusoitiin annostelemalla eläimeen myeliinioligo-dendrosyyttiglykoproteiinia (MOG) tai proteolipidiproteiinia (PLP). MOG-/PLP-antigeenin injektion seurauksena eläimen elimistö kehittää immuunipuolustusreaktion elimistön omaa luonnollista proteiinia vastaan, jota esiintyy keskushermostossa luonnollisesti (autoimmuunireaktio). Testattavan tutkimuslääkkeen annostelu alkoi joko samanaikaisesti tai vasta oireiden alettua. Muita toimenpiteitä olivat erilaiset käyttäytymistestit, kuvantamismittaukset ja selkäydinnesteen/verinäytteiden ottaminen. Kroonisessa mallissa ensimmäiset oireet havaittiin 10-20 päivää tautimallin indusoinnin jälkeen, ja eläimiä seurattiin tyypillisesti 30-50 päivää. Oireet ovat kroonisessa mallissa vakavampia kuin akuutissa mallissa (ei niin selkeää palautumista). Malliin kuuluvia oireita mitattiin pisteytysjärjestelmällä, joka kuuluu yhtenä osana lopetuskriteereihin. Tässä osahankkeessa käytettiin pääasiassa MOG-indusoituja kroonisia tautimalleja, joissa eläimiä seurattiin 1-2 kk ajan. Malli toimii hyvin, ja niistä saatavat tulokset olivat vertailukelpoisia.

OSAHANKE 4 - Cuprizone indusoitu demyelinaatiomalli: MS-taudin oireiden ja demyelinaation tutkimukseen käytetään cuprizonea (C14H22N4O2). Tyypillisesti yhdiste annosteltiin oralisuspension kaks kertaa päivässä 4-6 viikon ajan. Luvassa oli mainittu myös dieetin kautta annostelu, mutta tätä ei ole viime vuosina enää käytetty. Annostelun aikana tapahtui keskushermoston valkoisen aineen merkittävä väheneminen (demyelinaatio), joka aiheutti motorisen toiminnan ja impulssin kulun häiriöitä. Kun cuprizone-molekyylin annostelu lopetettiin, remyelinaatio eli valkoisen aineen palautuminen tapahtui 3-6 viikon kuluessa. Mallia käytettiin lähinnä autoimmuunirektiosta riippumattomaan (vrt. EAE) demyelinaatio/remyelinaatio-dynamiikan tutkimukseen ja hoitomenetelmiin, joissa pyritään edistämään tai kiihdyttämään remyelinaatiota tai hermoimpulssin kulkua. Eläimillä demyelinaatio todetaan pääasiassa MRI-kuvannuksella, mutta useissa tutkimuksissa

kuvannuksesta saatuja tuloksia on pyritty vahvistamaan myös käyttäytymistesteillä. Eläinten lopetuksen jälkeen kudoksista – erityisesti aivoista – on tutkittu tulehdus- ja solukuolemamarkkereita, myeliiniä tuottavien solujen vähenemistä ja myeliinin vähenemistä.

Lääkeaineannoilla selviteltiin lääkeaihion tehokkuutta myeliinikadon estämisessä, pysäyttämässä tai vähentämisessä. Muissa hankkeen kokeissa selviteltiin myeliinikatoon liittyviä prosesseja. Malli toimii hyvin ja niistä saatavat tulokset olivat vertailukelpoisia.

Mallia kehitettiin merkittävästi lupajakson aikana, sillä suoritetuissa kokeissa on selvinnyt turvalliset painorajat cuprizonelle altistettaville eläimille. Tämä pienensi tautimallin indusointiin tarvittavien eläinten määrää sekä vähensi vakavimpia hyvinvointiongelmia. Lisäksi cuprizonen annos määritetään nyt hiiren taustakannan mukaan, sillä olemme havainneet eroja eri hiirikantojen herkkyydessä cuprizonelle.

Vakavammassa mallissa cuprizonen annostellaan 12 viikkoa, minkä seurauksena demyelinaatio on pysyvämpi. Tämä malli soveltuu siten tutkimuksiin, joissa tutkitaan remyelinaatiota tehokkaasti lisäävien lääkeaineiden vaikutusta keskushermostossa silloin, kun elimistön oma myeliinin tuotanto on oligodendrosyyteissä vakavasti häiriytynyt/estynyt. Vakavan mallin tutkimuksia ei tehty tämän lupajakson aikana.

OSAHANKE 5. LPC (lysolesitiini) indusoitu fokaalinen demyelinaatiomalli. Kohdennetun demyelinaation malli MS:n taudin lääkeaineiden tehon tutkimiseen indusointiin infusoimalla valittuun keskushermostorakenteeseen (esim. aivokurkiainen, selkäytimen valkoinen aine) kerta-annoksena LPC:tä nukutettuun eläimeen. LPC aiheuttaa selektiivisen myeliinituhoon, joka kohdistuu rajatulle alueelle ja josta sen muutoksia lääkehoidon vasteena voidaan tutkia. Eläimet toipuivat infusiosta hyvin, ja käyttäytyivät normaalisti jo seuraavana päivänä. Eläimillä ei havaittu motorisia tai muita neurologisia oireita, ja lääkkeen tehotutkimukset perustuivatkin kuvantamiseen (MRI, SPECT, PET) ja aivonäytteiden histologisiin/immunohistokemiallisiin/biokemiallisiin analyysihin. Demyelinaatio ilmaantuu mallissa 2-3 päivän kuluessa LPC-infusion jälkeen, ja se palautuu osittain kokeen aikana 3-4 viikon kuluessa lähelle lähtötasoa. Kolme viikkoa oli tyypillisin seuranta-aika LPC-infusion jälkeen. Eläimille annosteltiin tutkittavaa lääkeainetta eri menetelmillä, selvästi yleisimmin p.o.-reittiä. Lopetuksen yhteydessä eläimiltä otettiin erilaisia kudoksenäytteitä, joista analysoitiin demyelinaatiota käyttäen immunohistologisia menetelmiä. Malli toimii hyvin ja niistä saatavat tulokset olivat vertailukelpoisia.

2. Millaista haittaa?

Osahankkeessa 1 (ALS) transgeenisistä eläimistä 450 kpl eli noin 50 % joutui vakavimpaan halvausoireluokkaan ja lopetettiin lopetuskriteerien perusteella. Kokeen tosiasiallinen vakavuusluokka oli vakava, kuten luvassa etukäteen ennakoitiin. Vakavuus johtui mallista ja oli odotettavaa. Erittäin harvoin lopetuskriteeri oli pelkästään suuri painonpudotus. Näin ollen eläimen ruokinta häkin pohjalta edesauttoi eläimen hyvinvointia.

Osahanke 2 tautimallia lopulta ei saatu toimimaan. Osahankkeen alla suoritettiin yksi koe, jossa lopetuskriteerien vuoksi lopetettiin 5 eläintä. Osalle poikasista ICV-infusio aiheutti vesipään muodustumista ja eläimet piti tämän vuoksi lopettaa.

Osahanke 3 MOG-inokuloiduista 351 kpl eli n. 26% eläimistä joutui vakavimpaan halvausoireluokkaan ja lopetettiin lopetuskriteerien perusteella. Tästä osa, noin 20 %, lopetuskriteerien takia

lopetetuista eläimistä jouduttiin lopettamaan painonpudotuksen takia riippumatta halvausoireen luokasta.

Osahankkeessa 4 cuprizonen annostelussa 79 kpl eli n. 20% kaikista annostelluista eläimistä jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella. Eläimillä ei ollut halvausoireita, mutta cuprizonen annostelu vaikutti niiden hyvinvointiin vakavasti. Useimmiten lopetuskriteerien perusteella lopetetut eläimet olivat pudottaneet painoaan yli 20% tai eläimen yleisvointi oli mennyt niin huonoksi, että se oli lopetettava (eläin oli liikkumaton, ei reagoinut ärsykkeisiin, ja oli merkkejä ruuan ja juomankulutuksen vähenemisestä). Kuolleisuutta saatiin laskemaan viimeisimmässä tutkimuksessa alle 10 %:iin mallikehityksen myötä.

Osahanke 5 LPC-demyelinaatiomallissa 1 eläin jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella. Eläimillä ei havaittu operaatiosta toipumisen jälkeen hyvinvointiongelmia. Tosiasiallinen haitta oli lievempi kuin etukäteen oletettiin.

3. 3R-mahdollisuudet

Muuta

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahanke 1	Hiiri	+	1800 hiirtä / 1150 hiirtä	Vakava / 896 kpl vakava, 37 kpl kohtalainen, 154 kpl lievä, ei toipumista 10 kpl	Vakava, Haitta on mallista johtuva	Aikaisemmat lopetuspisteet, eläimen ruokinta häkin pohjalta, pidennetyt nipat vesipulloissa, vesigeeliä kuppiin, häkin kuivikkeena sellainen puru, joka ei luista, naaraiden käyttö tutkimuksessa, sillä urokset ovat aggressiivisia ja ne pitää laittaa yksittäishäkkeihin.
Osahanke 2	Hiiri ja rotta	-	1800 hiirtä, 1800 rottaa / 54 hiirtä, 0 rottaa	Vakava / 20 kpl vakava, 29 kpl kohtalainen, 0 kpl lievä, ei toipumista 5 kpl	Vakava, Haitta on mallista johtuva	-
Osahanke 3	Hiiri ja rotta	+	1800 hiirtä, 1800 rottaa / 1521 hiirtä, 242 rottaa	Vakava / 1330 kpl vakava, 125 kpl kohtalainen, 258 kpl lievä, ei toipumista 4 kpl	Vakava, Haitta on mallista johtuva	Aikaisemmat lopetuspisteet, eläimen ruokinta häkin pohjalta, pidennetyt nipat vesipulloissa, vesigeeliä kuppiin, häkin kuivikkeena sellainen, joka ei luista, rakon toiminnan varmistaminen ja tarvittaessa tyhjennys
Osahanke 4	Hiiri	+	1350 hiirtä / 661 hiirtä	Vakava / 384 kpl vakava, 95 kpl kohtalainen, 183 kpl lievä, ei toipumista 0 kpl	Vakava, Haitta on mallista johtuva	Eläimen ruokinta häkin pohjalta, pidennetyt nipat vesipulloissa.

Osahanke 5	Hiiri ja rotta	+	1800 hiirtä, 1800 rottaa / 0 hiirtä, 479 rottaa	Vakava / 17 kpl vakava, 564 kpl kohtalainen, 0 kpl lievä, ei toipumista 6 kpl	Kohtalainen, Haitta on mal- lista johtuva. Muutamia eläi- miä luokiteltiin vakavaan ka- tegoriaan infuusiosta johtu- van komplikaation vuoksi.	-
------------	----------------	---	---	---	--	---

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	-	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	-	-
Pehmennetty ruoka häkin pohjalla	X	X	X	X
Pitkät nipat vesipulloissa	X	X	X	X

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Angiopoietiini-kasvutekijät verisuoniston ja imusuoniston toiminnassa tulehdustaudeissa ja syövässä.	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Syöpä, sydän- ja verisuonitaudit, imusuonisto, gm-hiiri	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Tutkimuksessa selvitetään verisuonten roolia vakavissa tuleh- duksissa, syövässä, sekä silmän verisuoniston sairauksissa. Hankkeessa selvitetään veri- ja imusuoniston merkitystä useissa erilaisissa patologisissa tilanteissa, joissa verisuonisto alkaa vuotaa. Tutkitaan myös syövän etäpesäkkeiden leviämi- sen syitä. Lisäksi tutkitaan imusuonten osuutta näihin, sillä kaksi kolmannesta syövän etäpesäkkeistä leviää imusuonten kautta.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	<p>Syöpä ja sydän- ja verisuoniston sairaudet ovat tärkeitä kuole- maan johtavia tekijöitä länsimaissa. Lisäksi silmän verisuoniston sairaudet aiheuttavat merkittävästi näön heikkenemistä.</p> <p>Tämän tutkimuksen tarkoituksena on tuottaa uutta perustietoa näistä sairauksista ja luoda pohjaa kliiniselle ja soveltavalle tut- kimukselle. Pitkällä tähtäimellä tavoitteena on luoda uusia hoi- tomuotoja. Lisäksi tutkimus tarjoaa tieteellistä tietoa veri- ja imusuoniston merkityksestä tulehdustiloissa, syövässä ja sil- män verisuoniston sairauksissa.</p>	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri: 1000 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	<p>Eläimille hankkeessa tehtävistä kirurgisista toimenpiteistä ai- heutuu kohtalaista haittaa. Käytettäviin eläinmalleihin liittyviä haittoja ovat kasvainten kasvu sekä tulehduskipu. Eläimet lope- tetaan kunkin osakokeen jälkeen.</p> <p>Vakavuusluokat: lievä, kohtalainen, vakava</p>	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	<p>Patologisissa tutkimusmalleissa on tärkeää saavuttaa mahdolli- simman hyvä fysiologinen tilanne eläintä käyttämällä. Veri- ja imusuoniston toiminta on sidoksissa ympäröivien kudosten fy- siologiaan. Solumalleilla ei pystytä samalla tavalla jäljentämään esimerkiksi syövän etenemistä tai tulehdusta, vaan koe-eläin- ten käyttö on ainoa tapa. Solumalleja käytetään aina kuin mah- dollista.</p>	

2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koe-asetelmat suunnitellaan huolellisesti, yhteen osakokeeseen käytetään 3-12 hiirtä ja kyseinen koe toistetaan maksimissaan kolme kertaa. Hankkeen puitteissa tehdään jatkuvaa suunnittelua, jotta eläinmäärää pystytään muokkaamaan hankkeen edetessä pienemmäksi. Pilottitutkimukset ovat avainasemassa.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a - Hiirellä on nopea lisääntymissykli ja sen genomisekvenssi tunnetaan hyvin. Hiiren biologiassa on yhtymäkohtia ihmisen biologiaan, mikä mahdollistaa ihmistä hyödyttävien hoidollisten sovellusten kehittämisen. b - Geenimuunnelluilla kannoilla voidaan selvittää mm. verisuonten eri komponenttien tärkeää roolia tulehduksessa ja syövässä. c – Kirurgiset toimenpiteet tehdään nukutuksessa ja kivunpoistosta huolehditaan. Eläimiä kipulääkitään tarvittaessa myös immunisaatioiden jälkeen. Kasvainkokeissa kasvaimen koon ei anneta kasvaa määrättyä koko suuremmaksi ja kasvaimia seurataan kuvantamalla.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 7.1.2021. Arviointi EK 7.1.2021: OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Tutkimuksessa haluttiin selvittää verisuonten roolia vakavissa tulehduksissa (sepsis, aiemmin verenmyrkytys) ja syövässä, jotka ovat merkittäviä kuolleisuutta aiheuttavia sairauksia.

Syöpäsolut leviävät verisuonia ja imusuonia pitkin ja muodostavat etäpesäkkeitä eli metastaseja. Sitä varten metastasoivien syöpäsolujen täytyy päästä tunkeutumaan primäärikasvaimen veri- tai imusuonistoon ja vastaavasti poistua suonistosta kudokseen muodostaen etäpesäkkeen.

Syöpähoitojen, mukaan lukien verisuoniin kohdistuvien uusien hoitojen teho on usein riittämätön ja suurimpana riskinä on kasvainten uusiutuminen tietyn ajan kuluttua. Tavoitteenamme on löytää uusia mekanismeja, joita estämällä syöpäkasvaimen leviämistä voidaan hillitä veri- ja imusuonia pitkin.

Osahanke 1 sisälsi tuumorikokeet, joissa tutkimme mitkä verisuoniperäiset tekijät vaikuttavat primäärituumorin kasvuun ja etäpesäkkeiden leviämiseen. Osahankkeessa 1 saimme alustavia tuloksia siitä, miten pian syöpäsolujen ja verisuonten vuorovaikutus johtaa muutoksiin verisuonistossa, joita tarvitaan siihen, että syöpäsolut kulkeutuvat verisuonten läpi ja siirtyvät kudokseen muodostamaan etäpesäkkeitä. Aikapisteen määrittäminen oli tärkeää, sillä haluamme ymmärtää laajemmin mitä verisuonistossa tapahtuu, kun syöpäsolu kulkee sen läpi ja jatkossa käytämme tätä aikapistettä näytteiden yksisolu-RNA-sekvenointiin, selvittääksemme verisuonistossa tapahtuvat muutokset syöpäsolujen leviämisessä aikana.

Osahankkeessa 2 keskityttiin vakaviin tulehduksiin liittyvän hiusverisuoniston vuodon tutkimukseen. Hillitsemällä tulehduksesta johtuvaa verisuonivuotoa kasvutekijöillä/vasta-aineella/lääkeaineilla tai

poistogeenisillä hiirimalleilla, tavoitteenamme oli tunnistaa uusia mekanismeja, jotka aiheuttavat haitallista verisuoniston vuotoa. Osahankkeessa 2 onnistuimme selvittämään, että b1-integriinillä on merkittävä rooli tulehduksen verisuonivuodossa. Estämällä b1-integriinin toimintaa vasta-aineilla tulehduksessa pystyimme estämään haitallista verisuonivuotoa. Lisäksi b1-integriinin deleetio verisuonistosta, vähensi verisuonivuotoa tulehduksessa. Nämä tulokset ovat merkittäviä, sillä tähän mennessä tulehdukseen liittyvään verisuonivuotoon ei ole pystytty kehittämään tehokkaita lääkkeitä. Tulokset on julkaistu ja tutkimusta jatketaan, sillä tulokset ovat erittäin lupaavia.

Hiiri on hyvä malli verisuonivuodon tutkimiseen. Sillä on nopea lisääntymissykli ja sen genomisekvenssi tunnetaan hyvin. Hiiren biologiassa on yhtymäkohtia ihmisen biologiaan, mikä mahdollistaa ihmistä hyödyttävien hoidollisten sovellusten kehittämisen. Sen biologiset yhteneväisyydet ihmiseen yhdistettynä kokoon ja nopeaan lisääntyvyyteen tekevät siitä hyvän mallieläimen ihmiselle suunnattuja hoitomuotoja tutkittaessa. Käytössämme on monipuolinen, veri- ja imusuonitutkimukseen liittyvä, transgeenisten hiirien kokoelma, joten solukokeilla tehdyt havainnot voidaan nopeasti todeta nisäkkäässä paikkansapitäviksi. Lisäksi vasta-aineiden saatavuus hiiren proteiineille on erittäin hyvä. Tulehdus ja syöpämallimme ovat alalla laajasti käytettyjä, ja voimme vaihtaa alan muiden tutkijoiden kanssa tietoa parhaista lähestymistavoista. Tämä vähentää käytettävien eläinten määrää suuresti.

2. Millaista haittaa?

Osahankkeessa 1 tosiasiallinen haitta oli joko lievää tai kohtalaista. Suurin osa hiiristä koki vain neulanpistosta aiheutuvaa lievää haittaa. Tuumorikokeet olivat pääosaltaan lyhytkestoisia, jolloin tuumori ei vielä ehtinyt muodostua eikä siten aiheuttanut hiirille haittaa. Osa hiiristä lopetettiin pidemmän ajan kuluttua tuumorisolujen injisoinnista, ja näillä hiirillä kasvaimet olivat jo ehtineet muodostua, mutta kasvaimet olivat vielä pieniä hiirten lopetusvaiheessa, jolloin hiirten kokema haitta oli korkeintaan kohtalaista. Kirurgisia toimenpiteitä ei hiirille tehty.

Osahankkeessa 2 hiirten kokema haitta oli lievää tai kohtalaista. Maksimiannoksilla (25mg/kg) LPS johtaa kuolemaan n. 50% hiirillä 24 h kuluessa ja 100% 48 h kuluessa. Omissa kokeissamme käytimme matalampaa annosta n. 11-15 mg/kg LPS, mikä on vähemmän kuin maksimiannos eikä siten aiheuta hiirten menehtymistä (takautuvan arvioinnin mukaan 4% hiiristä menehtyi (maksimiannoksella 11 mg/kg, 16h), mikä ei eroa esimerkiksi yleisen anestesian menehtymisriskistä).

LPS:n seurauksena tulehduksen edetessä hiirten ruumiin lämpö laskee ja myöhemmissä aikapisteissä myös liikkuminen hidastuu. Hiiriä seurattiin ja arvioitiin tarkasti, jotta todellinen haitta pystyttäisiin arvioimaan ja havaittiin, että kokeen päättyessä (LPS 16h -18h) eläimet eivät saavuttaneet varhennettujen lopetuskriteerien pisteytystaulukon mukaan luokkaa 4 kahdessa parametrissa, tai päivän aikana luokkaa 4 kaikissa kahdeksassa parametrissa, mikä olisi edellyttänyt lopetusta kesken kokeen (ks. Havaitut haitat punaisella taulukossa). Referenssiksi julkaisu (Lilley et al., SHOCK, Vol. 43, No. 4, pp. 304Y316, 2015), jossa lukee pisteytystaulukon kohdalla: "During the day, animals will be humanely killed if they reach a score of 4 in all eight parameters. During the night, animals will be humanely killed if they reach a score of 4 in two parameters. Regardless of total score, any animal found to exhibit a complete lack of activity or eyes closed when stimulated, gasping, or collapsed with head down will be humanely killed immediately."

Clinical criteria	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Fur Aspect	Actively grooming	Dulling of hair coat	Rough hair coat	Piloerection
Activity	Normal activity	Reduced activity disturbed	No activity disturbed, reduced activity stimulated	Nil activity disturbed or stimulated
Posture	Normal	Slightly hunched, moving freely	Hunched with stiff movement/posture	Hunched with no movement stimulated
Behavior	Normal	Slow normal when disturbed	Abnormal disturbed, relocated only when stimulated	Abnormal when disturbed or stimulated, no relocation
Chest movements	Normal	Mildly dyspneic	Moderately dyspneic	Severely dyspneic with thoracic abdominal respiration
Chest sounds	No	Occasional chirping	Frequent chirping	Wet chirping increased when stimulated
Eye lids	Normally opened spontaneously	Normally opened disturbed	Near closed when stimulated and disturbed	Closed disturbed, near closed stimulated
Body weight loss	0%-5%	5%-10%	>15%	>20%

Kipuilmien tarkastelu osoitti lisäksi, että akuutin tulehdusmalli -kokeen päättyessä kipu on kohdalaista. Koska kokeen tarkoituksena on vakavan tulehduksen tutkiminen, tulehduskipulääkkeitä ei voida käyttää. Kipulääkkeiden käyttöön ei ole myöskään indikaatiota ihmisten hoidosta, sillä sepsipotilaita ei myöskään hoideta kipulääkkeillä, sillä tulehdus itsessään ei aiheuta kipua. Lisäksi, opioidien käytöstä on sepsipotilailla näyttöä, että opioidit lisäävät kuolleisuutta.

Eläimiä ei jouduttu lopettamaan lopetuskriteereiden perusteella, vaan eläimet lopetettiin kokeissa ennen kuin ne täyttivät yleiset lopetuskriteerit.

Toimenpiteet, joita olivat lähinnä neulanpistot, onnistuivat hyvin eivätkä aiheuttaneet hiirille ylimääräistä haittaa.

3. 3R-mahdollisuudet

Hiirikokeita edelsi in vitro-kokeet soluilla, joiden tulosten perusteella suunnittelimme eläinkokeet.

Eläinkokeista kerättiin aina kaikki mahdolliset kudosnäytteet, jotta kokeita ei tarvitsisi toistaa tämän takia.

Olemme ottaneet käyttöön lyhyemmät aikapistet, jolloin tulehdus ei ole vielä niin voimakas ja hiirten kokema haitta on lievempi.

Tarjoamme hiirille häkkiin veteen sekoitettua rehua, josta hiiret saavat ravinnon ja juoman helpommin kokeen aikana.

Muuta

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahanke 1, Tuumorikokeet/Tuumorisolujen istuttaminen ihonalaisesti	Hiiri	Tuumorikokeet antoivat alustavia tuloksia, joita hyödynnetään jatkossa.	Osahanke 1 arvioitu kokonaisuudessaan 200, joista 22 käytetty ihonalaiseen tuumorimalliin	Vakava/ Lievä (Sv2) (6/22), Kohtalainen (Sv3) (16/22)	Ei vakavaa haittaa	Kokeet olivat lyhytaikaisia, jolloin tuumori ei ehtinyt joko kasvaa ollenkaan tai vain pieneksi, jolloin vakavaa haittaa ei hiirille koitunut.
Osahanke 1, Tuumorikokeet/Syöpösolujen annostelu laskimon sisäisesti	Hiiri	Tuumorikokeet antoivat alustavia tuloksia, joita hyödynnetään jatkossa.	Osahanke 1 arvioitu kokonaisuudessaan 200, joista 75 käytetty laskimon sisäiseen tuumorimalliin	Vakava/ Ei toipumista (Sv1) (3/75), Lievä (Sv2) (61/75), Kohtalainen (Sv3) (11/75)	Ei vakavaa haittaa	Kokeet olivat lyhytaikaisia, jolloin tuumori ei ehtinyt joko kasvaa ollenkaan tai vain pieneksi, jolloin vakavaa haittaa ei hiirille koitunut.
Osahanke 2, Tamoksifeenin annostelu	Hiiri	Osa tavoitteista saavutettiin, mutta tutkimus jatkuu.	Osahanke 2 arvioitu kokonaisuudessaan 400, joista 417 käytetty pelkästään tamoksifeenin annosteluun	Vakava/ Lievä (Sv2) (340/417), Kohtalainen (Sv3) (19/417), Vakava (Sv4) (58/417)	Vakavin haitta oli poikasten kuolleisuus tamoksifeenin annostelun jälkeen. Poikasten kuolleisuus johtui sekä geenin poistosta aiheutuvasta haitasta, että satunnaisesti injisoinnista aiheutuvasta haitasta.	Poikasten satunnainen kuolleisuus tamoksifeenin annostelun jälkeen on saatu minimoitua pienentämällä injisointi tilavuutta. Lisäksi geenin poistosta johtuvat poikaskuolemat estetään jatkossa niin, että poikaset analysoidaan muutaman päivän sisällä tamoksifeenin annostelusta tai tamoksifeeni annostellaan vanhemmille poikasille, jolloin geenin poisto ei ole niin haitallista.

Osahanke 2, Systeemisen- tulehduksen tuottaminen	Hiiri	Tulehduskokei- den osalta saa- vutimme sen hetkiset tavoit- teemme, lupaa- vista tuloksista johtuen tutki- mus kuitenkin jatkuu.	Osahanke 2 arvi- oitu kokonais- määrä 400, joista 959 käytetty sys- teemisen tulehduk- sen tuottamiseen	Vakava/ Ei toipumista (Sv1) (107/959), Lievä (Sv2) (341/959), Kohtalainen (Sv3) (498/959), Vakava (Sv4) (13/959)	Vakavin haitta oli, että jos- kus harvoin hiiri löytyi kuolleena häkistä LPS pis- toksen jälkeen. Lisäksi haittana oli etenevän tu- lehduksen aiheuttama hiirten lämpötilan nousu, liikkumattomuus, ja syö- mättömyys.	Eläinten hyvinvointia on parannettu tarjoa- malla niille veteen sekoitettua rehua ko- keen ajan, josta ne saavat ravinnon ja juo- man helpommin. Olemme myös tarkastel- leet ja kirjanneet ylös hiirten kipuilmeet, jotta pystymme havaitsemaan heti, jos hii- ret kokevat kokeen aikana kipua. Keräämme kokeista paljon näyttöä, jotta kokeita ei tarvitsisi toistaa turhaan. Jatkossa käy- tämme myös tulehduskokeissa lyhyempiä aikapisteitä, jolloin hiirille aiheutuva haitta on pienempi.
--	-------	--	--	--	--	--

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	-	-	-
Veteen sekoitettu rehu	X	-	X	-

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ

Hankkeen nimi	Solujen hypoksiavastetta säätelevien entsyymien inhibition vaikutus kokeelliseen autoimmuunisen enkefalomyeliitin (MS-tautimalli) taudinkuvaan.	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Hypoksia, HIF-prolyylihydroksylaasit, MS-tauti	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Ei
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>MS-tauti on etenevä keskushermoston toimintaan vaikuttava immuunivälitteinen sairaus, johon ei tunneta tehokasta hoitokeinoa.</p> <p>Hankkeen ensisijainen tavoite on tunnistaa poistogeenisistä eläinmalleista ne hypoksiavastetta säätelevät entsyymit, joiden inhibitio voisi parantaa MS-taudin kuvaa ja hidastaa taudin etenemistä sekä vähentää potilaiden oireilua.</p> <p>Tutkimuksesta saatava tieto voi auttaa meitä kehittämään lääkkeitä (inhibiittoreita) MS-taudin hoitamiseksi. Hankkeen toissijainen tavoite on tunnistaa mahdollinen mekanismi näiden lääkkeiden mahdolliselle parantavalle vaikutukselle.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tämä työ tehdään yhteistyössä Yhdysvaltalaisen Fibrogen Inc. kanssa. Yritys tuottaa HIF-prolyylihydroksylaasien inhibiittoreita ihmisaikautusten hoitoon (esim. anemia). Tutkimuksemme yksi tarkoitus on analysoida voitaisiinko MS-taudin etenemiseen tai oireiden helpottamiseen vaikuttaa täsmäläkkeillä, jotka kohdistuvat ko. entsyymeihin.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Hiiri, 320 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille aiheutuu haittaa taudin indusoinnissa tehtävistä annosteluista, sekä taudin etenemisestä (lihaskuivuminen, halvautumisoireilu).	
Vakavuusluokat: vakava		
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Koska MS-tauti on autoimmuunisairaus, on sitä vaikeaa tutkia solumalleissa, sillä niillä ei voida matkia immuunivasteen syntymistä sekä hermostomuutoksia.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	Eläimiä käytetään ainoastaan sellaisia lukumääriä, jotka mahdollistavat tarvittavan tilastoanalyysin tuloksista. Sarjat pyritään suunnittelemaan niin, ettei koetta tarvitsisi uusia. Lisäksi esitutkimuksissa on käytetty mahdollisimman paljon	

	solumalleja, jotta tarvittavaa taustatietoa saataisiin kokeen järjestyksestä.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Eläinlaji on valittu a) aikaisempien tutkimustuloksien perusteella, b) koska hiiri on toistaiseksi ainoa laji, jossa geenimanipulaatio on laajassa mittakaavassa mahdollista ja c) koska hiiri on yleisemmin käytetty malliorganismi, jolloin tulosten vertailu eri tutkimusryhmien välillä on mahdollista. Eläimille aiheutettu vahinko minimoidaan aktiivisella seurannalla sekä hoito- toimenpiteillä, joiden avulla eläin saa helposti tarvitsemansa ravinnon ja nesteytyksen. Lisäksi käytämme lyhennettyä oireiden luokitusta, jolloin eläin ei kokisi turhaa kipua.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 22.6.2020. Arviointi E.Kaliste 30.6.2020 OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankeen tarkoitus oli tutkia elimistömme happisensoreiden vaikutusta oireisiin ihmisen multippelia skleroosia mallintavalla hiirimallilla (MOG35-55 induoitu EAE-malli). Tulostemme mukaan elimistömme neljästä happisensorista kahdella on merkittävä oireita lieventävä vaikutus taudin oirekuvaan. Yhdellä happisensoreista ei havaittu mitään vaikutusta ja yhdellä puolestaan on alustavien kokeiden jälkeen oireita pahentava vaikutus. Tutkimuksemme jatkuvat vielä soluviljelykokeiden muodossa. Lisäksi analyysimme eläinkokeista saatavista näytteistä ovat vasta loppuillaan, mutta valmistunevat syksyn aikana. Tuloksemme antavat olettaa, että happisensoreihin kohdistuvilla inhibiittoreilla saataisiin voida lieventää EAE:n oireita, mutta tulokset eivät ole vielä suoraan hyödynnettävissä ihmistaudin oireilun lieventämiseen, sillä käytettävissä olevat inhibiittorit saattavat aiheuttaa tietojemme mukaan myös haitallisia sivuvaikutuksia.

Eläinmalli on siltä osin tähän tutkimukseen sopiva, koska se on ainoa missä yksittäinen geeni voidaan täsmällisesti manipuloida, ja lisäksi meillä oli tämä työkalu jo valmiiksi käytettävissämme. Näin pystymme identifioimaan kunkin happisensorin merkityksen tautimallissa, ja ehkä myöhemmin kehittämään täsmällisempiä inhibiittoreita haluttua happisensoria vastaan. Inhibiittoreiden kehittäminen on haastavaa, koska ko. entsyymit ovat toisillensa isoentsyymeitä, eli katalysoivat samoja reaktioita sekä niiden aminohappohomologia on varsin suurta.

2. Millaista haittaa

-Mikä oli tosiasiallinen haitta ja vakavuusluokka, millaista vakava-luokan haitta oli? Tiedot taulukkoon nro 1.

Hankehakemuksessa on liitteenä oireiden vakavuusluokittelu. Dokumentista ilmenee erilaiset oireet, joita kohtasimme kokeen aikana. Vakavimmat oireet ovat vakavuusluokassa 4, jonka saavutettuaan eläin lopetettiin.

-Miten toimenpiteet onnistuivat eläinten hyvinvoinnin kannalta / millaisia haittoja eläimille aiheutui? Oliko tosiasiallinen haitta sellainen kuin etukäteen oletettiin?

Tosiasialliset haitat osuivat hyvin ennustuksiimme, jotka ilmenevät vakavuusluokittelussa.

-Tuliko yllätyksiä? Kuinka paljon eläimiä jouduttiin lopettamaan lopetuskriteereiden perusteella?

Lopetuksia jouduttiin tekemään 24 kpl perustuen lopetuskriteereihin.

3. 3R-mahdollisuudet

-Onko käytettävänä uusia vaihtoehtoisia menetelmiä eläinten käytön tilalle?

Valitettavasti ei ole suoraan, sillä tässä seurataan halvaantumisoireita. Itse autoimmunisaation toteutusta tutkitaan toki soluviljelymalleilla, mutta osassa niitäkin autoimmunisaatio joudutaan tekemään eläimessä.

-Voisiko toimenpiteiden toteuttamistapaa ja/tai hoitomenetelmiä edelleen kehittää?

Olemme kehittäneet hoitomenetelmiä eteenpäin. Eläimet totutetaan korkeaenergiseen ruokavalioon n. 2 viikkoa ennen autoimmunisaatiota (ts. MOG/PTX-injektioita). Lisäsimme ruokavalioon myös korkeaenergiset ravintopelletit, joilla korvattiin kondensoitu maito, joka käytännössä sotki eläimiä, jolloin niitä jouduttiin rasittamaan pesemällä maitoa pois. Kaikki ravinto lasketaan matalaksi halvausoireiden ilmettyä, jotta eläimet saavat ravinnon helposti. Eläinten liikkumista helpotettiin oireiden alkaessa asettamalla siihen tarkoitettu metallinen verkko häkin pohjalle sekä muuttamalla pesämateriaali pehmeämmäksi, jotteivat juutu raajoistansa materiaaliin kiinni oireiden pahentuessa. Fysiologisen suolan sijasta nesteytystä tarvitseville annettiin aina glukoosia, joka paransi eläinten oloa/selviytymistä. Hoituhuoneen lämpötilaa myös nostettiin oireiden pahetessa. Erittäin tärkeäksi koimme, että eläimet saavat olla omassa oloissaan täysin rauhassa, ilman asiattomien läpikulkua. Myös hoitohenkilökuntaa koulutettiin tähän taholtamme.

-Voisiko inhimillisiä lopetuspisteitä aikaistaa?

Ei voi, sillä olemme sen jo aikaistaneet lupahakemuksessamme. Emme etene kokeissamme graduksien 5, joka tarkoittaa neliraajahalvausta. Kun eläimet saavuttivat graduksen 4, ne lopetettiin. Eläimiä ei lopetettu graduksen 4 vuoksi mitenkään paljon, sillä esitestasimme huolellisesti eri PTX-erät, joiden konsentraatio vaikuttaa suoraan oireiden vakavuuteen. Melkein kaikki graduksien liittyvät lopetukset tapahtuivat ainoastaan yhdessä alkuperäisistä kohorteistamme.

-Pitäisikö eläinmääriä muuttaa?

En näe tarpeelliseksi. Emme pystyneet tekemään kaikkia kokeitamme halutulla tavalla, sillä kaupallisten PTX-erien muuttuminen kokeen aikana aiheutti meille suuria ongelmia. Samoin tutkijoiden ja hoitohenkilökunnan (muiden kuin omien tutkijoidemme tai hoitohenkilökunnan) huolimaton käytös kokeen aikana, joka stressasi hiiriä luultavasti väärin osaa tuloksista. Luultavasti joudumme hakemaan myöhemmin uuden luvan, jotta saamme tehtyä jatkokokeemme.

-Voisiko käytetyistä eläimistä saada enemmän tietoa hyödynnettäväksi?

Keräämme kaiken mahdollisen tiedon eläimistä julkaisuamme varten. Luulen että menetelmämme muuten on yleisessä tiedossa.

-Olisiko keksityillä 3R-keinoilla laajempaa hyödynnettävyyttä?

Menetelmämme ovat standardisoituja, ja käytössä kaikkialla. Niitä hyödynnetään nimenomaan EAE-mallien tutkimuksessa.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mal- lista aiheutuva vai sa- tunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläin- ten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentä- mään?
	Hiiri		1310/356	Vaihtelee välillä lievä-vakava. Koe perustuu vaka- vuusasteiden luo- kitteluun.	Kahden raajan täydellin halvaantuminen tai kohtuullinen neljän raajan halvaantumi- nen. Oli toistuva ja toistui jokaisessa tut- kimuskohortissa.	<p>Haittaa ei voida suoraan vähentää, sillä se kuuluu tämän MS-tautimalliin etenemiseen ja siihen liittyvään kliiniseen arviointiin. Rajoitimme seurannan myös n. 1 kk, koska mie- lestämme se tässä vaiheessa riittää ja antaa meille tarvit- tavan informaation. Tekemällä asianmukaiset esitestit, eläinten määrää voidaan kyllä jonkin verran vähentää. Li- säksi, riippuen tavoitteista, T soluja ja niiden ominaisuuksia voidaan tarkemmin tutkia soluviljelyä hyväksikäyttäen. Tämä vähentää myös käytettävien eläinten määrää, tai ai- nakin kokeen pituutta, mutta sovellettavuus riippuu täysin tavoitteista. Pyrimme tässä tutkimuksessa käyttämään eri- tyisesti soluviljelyä hyväksemme mahdollisimman paljon.</p> <p>Muutoin eläinten tilaa on pyritty helpottamaan paremman ruokavalion, riittävän nesteytyksen sekä jatkuvan seurannan avulla. Myös ruuan ja juoman saamista on häkeissä helpotettu asettamalla ravinto mahdollisimman alas. Li- säksi häkin pohjalla käytetään verkkoa, joka helpottaa osit- tain halvaantuneen eläimen liikkumista ja ruokailua. Myöskin pesämateriaalia on muutettu pehmeämmäksi, jottei ns. normaali pesämateriaali tartu niin helposti jalkoi- hin kiinni.</p>

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	x	-	-	x
Lyhyempi seuranta-aika	x	-	-	x
Pesämateriaali	x	x	x	x
Hoituhuoneen lämpötila	x	x	-	-
Totuttaminen	x	x	x	x
Korkea-energinen ravitseminen	x	x	x	x
Soluviljelumenetelmät	x	-	x	x

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ

Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen neuropaattisen kivun prekliinisisissä tautimalleissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Neuropaattinen kipu; allodynia, iskiasherma	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope-tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie-teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Hankkeen tavoitteena on kehittää neuropaattisen kivun malleja rotassa ja hiiressä, sekä testata uusia tehokkaita neuropaattisen kivun hoitomuotoja ihmisille. Neuropaattinen kipu eroaa spontaanista kivusta tyypiltään, kestoltaan ja intensiteetiltään. Se koetaan usein ”hermoja raastavana” poltteluna, kihelmöintiä, puutumisenä tai pistelynä, joka ei välttämättä ole intensiteetiltään erityisen voimakasta, mutta jonka jatkuminen erityisen pitkiä ajanjaksoja (jopa >10 v) tekee siitä huomattavan psykososiaalisen ongelman yksilötasolla.</p> <p>Neuropaattinen kipu aiheutetaan joko kirurgisesti tai kemiallisesti, riippuen tautimallista. Neuropatian ilmentyminen ja intensiteetti todennetaan käyttäytymistestein, minkä jälkeen oireiston kehittäneille eläimille voidaan annostella tutkittavaa lääkeainetta erilaisin väliajoin ja annostelutavoin.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötystä hankkeen tuloksista)	<p>Neuropaattinen kipu on tyypillinen oire lukuisissa erilaisissa patologisissa tiloissa, joiden esiintyvyys, todennäköisyys, ja yleensä myös vakavuusaste lisääntyvät eliniän noustessa, mikä tarkoittaa neuropaattisen kivun yleistymistä entisestään.</p> <p>Neuropatioiden taustalla olevien ilmiöiden ymmärtäminen edesauttaa uusien lääkkeiden entistä tarkempaa kohdentamista juuri kipua aiheuttaviin mekanismeihin (reseptorit, ionikanavat).</p>	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta 3000, hiiri 3000	
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	<p>Eläimet tulevat kärsimään jonkinasteisesta kivusta, joka silti hyvin harvoin – jos koskaan - on intensiteetiltään kovaa. Käyttäytymistestit, lääkintä, ja mahdollinen kuvantaminen kokeen aikana aiheuttavat eläimille kohtalaista haittaa. Muut toimenpiteet – kuten verinäytteen otto anestesiassa - aiheuttavat eläimille lievää haittaa. Tutkimuksen lopussa eläimet lopetetaan histologisia tutkimuksia ja veren biomolekyylien pitoisuusmäärittäystä varten.</p> <p>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</p>	

3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
<p>1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</p>	<p>Nisäkäsorganismissa toimivat monimutkaiset syy - ja seuraus-suhteet säätelevät elion kokonaistoimintaa molekyyli- ja solutasolta aina monimutkasiin kognitiivisiin ja psykofysiologisiin toimintoihin. Neuropaattisen kivun mallinnuksessa ja mallien käytössä tutkimuksen työkaluina ei voida käyttää korvaavaa menetelmää, koska niin kipu kuin sen paraneminenkin on todennettava käyttäytymistestein, joita ei alemmilla organismeilla ole mahdollista tehdä.</p> <p>Lisäksi kliinisiin kokeisiin tähtäävien uusien lääkeaineiden teho, vaste ja turvallisuus on aina todennettava prekliinisesti <i>in vivo</i>.</p>
<p>2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</p>	<p>Koeasetelmat ovat standardoituja ja perustuvat yksityiskohtaiseen mallivalidointeihin. Validointityöllä varmistetaan, että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ilmentäen oikeanlaista tauti- ja lääkevastetta. Mallivalidaatiolla ja voima-analyysillä voidaan ennustaa ryhmäkoot, jotka minimoivat eläinten.</p> <p>Turhia kokeita ja koeosioita vältetään ottamalla etukäteen selvää malliin mahdollisesti kuuluvista komplikaatioista ja muista hyvinvointiin liittyvistä riskeistä, jolloin esimerkiksi tarvittava tukihoido (kuten nesteytys) voidaan suunnitella.</p>
<p>3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</p>	<p>Kaikissa hankkeen osakokeissa käytetään hiirtä tai rottaa, johtuen niiden lukuisista eduista verrattuna muihin mahdollisiin koe-eläinlajeihin. Hiiren ja rotan hyötysuhde (eläinmäärä ja tarvittavat resurssit suhteessa saatavaan informaatioon) on huomattavan hyvä johtuen niiden ominaisuuksista, kuten nisäkäs-fysiologiasta ja -biologiasta, ruumiin koosta, ylläpitoon ja toimenpiteisiin liittyvistä vaateista, sekä yleensä selkeistä vasteista testattaville lääkeaihoille.</p> <p>Huolellinen mallivalidaatio, koulutettu henkilökunta ja tarpeeksi tiivis eläinten hyvinvoinnin seuranta varmentavat eläimille koituvan haitan minimoinnin yhdessä ylläpito-olosuhteiden optimoinnin, käytettävän eläinmäärän minimoinnin, mahdollisten kivunlievityskeinojen käytön ja humanien lopetuskriteerien avulla.</p>
<p>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</p>	<p>KYLLÄ</p>

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispäivä 7.4.2020. Arviointi EK 7.6.2020 – OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja neuropaattisen kivun hoitoon testaamalla lääkeaineiden tehoa eläinmalleissa. Muutosluvassa 1 haettiin lupaa uuden neuropaattisen kipumallin pystyttämiseksi (kylmä-indusoitu kipumalli). Muutosluvassa 2 validoitiin käyttöön

akuuttia kipua mallintava intraplantaari-injektio-malli. Tämän mallin tarkoituksena on mahdollistaa neuropaattisen kivun malleja tukeva, huomattavan lyhytkestoinen malli, jonka avulla voidaan mm. seuloa tehokkaasti potentiaalisia uusia kipulääkkeitä. Muutoslupa 3 jatkoi alkuperäisen luvan voimassaoloa 5 kk.

Käytettävät eläin- ja tutkimusmallit soveltuivat hyvin tähän tutkimukseen kussakin osahankkeessa: Osahanke 1 Spinaalihermoligaatio (SNL; Spinal Nerve Ligation), osahanke 2 Iskiashermon vauriomallit: Osittainen hermopinne (partial sciatic nerve ligation; PSNL) (ei käytetty), osahanke 3 Iskiashermon vauriomallit: säästävä hermovaurio (spared nerve injury; SNI), osahanke 4 Iskiashermon vauriomallit: iskiasherमतulehdus (SIN; Sciatic Inflammation, neuritis), ja osahanke 5 Kemoterapia-indusoitu polyneuropatia (CIPN; Chemotherapy Induced Polyneuropathy).

Tutkimusmallit toimivat odotetusti ja niiden avulla voitiin arvioida luotettavasti testattujen lääkeainekandidaattien tehoa. Ainoastaan osahankkeessa 2 ei käytetty lainkaan eläimiä.

2. Millaista haittaa?

Osahanke 1 oli arvioitu lupakäsittelyssä haittaluokituksestaan vakavaksi. Takautuvan arvion perusteella tosiasiallinen haitta oli pääosin vakavaa. Toimenpiteet onnistuivat pääosin suunnitellusti ja vain muutamille eläimille aiheutui odottamatonta haittaa hyvinvoinnille. Eläimet toipuivat varsinaisesta toimenpiteestä hyvin, mutta 23 yksilöä lopetettiin lopetuskriteerien perusteella muutaman päivän kuluessa toimenpiteestä. Nämä ennenaikaiset lopetukset liittyivät yleensä eläimen auki repimisiin tikkeihin ja haavoihin tai operoidun raajan puremiseen, mikä on neuropatian oire.

Osahankkeessa 3 haittaluokitus oli arvioitu lupakäsittelyssä vakavaksi ja tosiasiallinen haitta oli myös vakava. 94 rottaa lopetettiin lopetuskriteerien perusteella muutaman päivän kuluessa toimenpiteestä. Nämä yleensä ennenaikaiset lopetukset liittyivät eläimen auki repimisiin tikkeihin ja haavoihin tai operoidun raajan puremiseen.

Osahankkeen 4 haittaluokitus oli arvioitu lupakäsittelyssä vakavaksi ja tosiasiallinen haitta oli myös vakava. 11 rottaa lopetettiin lopetuskriteerien perusteella muutaman päivän kuluessa toimenpiteestä. Nämä ennenaikaiset lopetukset liittyivät yleensä eläimen auki repimisiin tikkeihin ja haavoihin tai operoidun raajan puremiseen.

Osahankkeen 5 haittaluokitus oli arvioitu lupakäsittelyssä kohtalaiseksi ja tosiasiallinen haitta oli myös korkeintaan kohtalaista. 9 eläintä lopetettiin lopetuskriteerien perusteella. Tässä mallissa sattuneet hyvinvointiongelmien liittyivät solumyrkky oksaliplatiiniannostelun aiheuttaman yleiskunnon heikkenemiseen. Solumyrkyn annostelun loputtua eläimet pääasiassa toipuivat hyvin.

Muutosluvassa 1 alla (kylmäindusoitu) testattiin ainoastaan yksi koe. Mallia ei saatu toimimaan halutulla tavalla.

Muutosluvassa 2 validoitiin käyttöön akuuttia kipua mallintava intraplantaari-injektio-malli saatiin toimimaan lupaavasti. Erityisesti AITC-injektio-malli saatiin toimimaan hyvin ja sillä voidaan jatkossa seuloa mahdollisia lääkeaine-aihoita ennen siirtymistä pitkäkestoisempiin NP-kivun malleihin. Kivun kesto ja vakavuus oli arvioituna lievempää (ei toipumista tai kohtalaista) kuin pääluvassa muut mallit. Yhtään eläintä ei tarvittu lopettaa lopetuskriteerien perusteella.

3. 3R-mahdollisuudet

Kaikissa tutkimusmalleissa on ollut käytössä pehmennettyä rehua sekä pitkänippaiset juomapullot ja lämpömattoja toimenpiteiden jälkeen. Eläimen kunnon arvioinnissa on käytetty apuna mm. eläimen painon putoamista, liikkumiskykyä ja yleiskunnon kehittymistä. Kirurgiaan liittyen on kiinnitetty huomiota aseptiikkaan, leikkausmenetelmiin ja koulutukseen. Tämän lisäksi eläinten post-operatiivista hoitoa ja eläinten tarkkailua on kehitetty. Auennutta haavaa tikattiin uudelleen vain yhden kerran. Jos haava kuitenkin aukesi toisen kerran, eläin lopetettiin. Eläin lopetettiin myös, jos eläin vahingoitti operoitua raajaa.

Muutosluvan 2 etuna oli lyhytkestoinen kivun akuutti luonne ja siitä johtuva hyvin lyhyt seuranta-aika: testit tehtiin kahden päivän sisällä, ja kipu lieventyi ja hävisi arvioiden mukaan muutaman tunnin kuluessa injektiosta. Kyse oli ohimenevästä, lyhytkestoisesta (muutamasta minuutista korkeintaan 24 tuntiin), ja kertaluonteisesta kivusta, ja verrattuna pääluvan osahankkeiden vakavuuteen on lievempi. Osa menetelmistä oli kokonaisuudessaan non-invasiivisia (Laser-Doppler kuvannus) ja tehtiin kokonaan anestesiassa, jonka jälkeen eläin lopetettiin. Malli tarjosi hyvän mahdollisuuden seuloa lääkekandidaatteja, joilla voisi olla vaikutuksia kipumekanismeihin. Näin ollen kaikkia potentiaalisia lääkeaihoita ei tarvinnut testata vakavammissa pitkäkestoisissa kirurgisissa malleissa. Tällä tavoin pääluvan alla testattujen eläinten keskimääräinen haitta oli vähäisempi.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Erityistä aiheutettuun haittaan liittyen: esim. satunnainen / toistuva, saatu vähenemään/ loppumaan 3R-keinoin	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa?
Yhteen-veto:	Rotta + hiiri	Tutkimusmalli soveltui tähän tutkimukseen ja antoi luotettavia tuloksia (+). Myös tutkimuksen tavoitteet palveluntarjoajan näkökulmasta saavutettiin: Asiakastutkimukset suoritettiin protokollan mukaisesti (+). Tutkimustulokset lähetetty asiakkaalle protokollan mukaisesti (+).	Rotta 3000 / 2207 Hiiri 3000 / 1884	Rotta: Vakava-1158, Kohtalainen-629, Lievä-258, Ei toipumista-168 Hiiri: Vakava-3, Kohtalainen-1523, Lievä-345, Ei toipumista-10	Vakavimmat haitat liittyivät tutkimusmalliin tai leikkauksen jälkeen tapahtuneisiin hyvinvointiongelmiin, joiden syynä oli neuroopaattinen kipu.	Tukihoito toimenpiteiden jälkeen, lisälämmön tarjoaminen ensimmäisen vuorokauden aikana. Eläimen kunnon arvioinnissa on käytetty apuna mm. eläimen painon putoamista, liikkumiskykyä ja yleiskunnon kehittymistä. Kirurgiassa on kiinnitetty huomiota aseptiikkaan, leikkausmenetelmiin ja koulutukseen. Eläinten post-operatiivista hoitoa ja eläinten tarkkailua on kehitetty. Auennutta haavaa tikattiin uudelleen vain yhden kerran. Jos haava kuitenkin aukesi toisen kerran eläin lopetettiin tai jos eläin vahingoitti operoitua raajaa neuropatian oireiden vuoksi.
Osahanke 1: Spinaalihermoligatio	Rotta + hiiri	Kts. yhteenveto	Rotta: 431	Vakava-387, Kohtalainen-10, Lievä-26, Ei toipumista-2	Kuolleena löydettyjen määrä: 1 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 23. Vakavimmat haitat liittyivät tutkimusmalliin tai leikkauksen jälkeen tapahtuneisiin	Kts. yhteenveto

					hyvinvointiongelmiin, joiden syynä oli neuropaattinen kipu.	
osahanke 2 Iskiashermon vauriomallit: Osittainen hermpinne	Rotta + Hiiri	Tätä mallia ei tehty lainkaan.	0	N/A	N/A	N/A
osahanke 3 Iskiashermon vauriomallit: säästävää hermovaurio	Rotta + Hiiri	Kts. yhteenveto	Rotta: 829	Vakava-690, Kohtalainen-100, Lievä-3, Ei toipumista-48	Kuolleena löydettyjen määrä: 4 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 103 Vakavimmat haitat liittyivät tutkimusmalliin tai leikkauksen jälkeen tapahtuneisiin hyvinvointiongelmiin, joiden syynä oli neuropaattinen kipu.	Kts. yhteenveto
osahanke 4 Iskiashermon vauriomallit: iskiashermostulehdus	Rotta + Hiiri	Kts. yhteenveto	Rotta: 98	Vakava-81, Kohtalainen-0, Lievä-17	Kuolleena löydettyjen määrä: 0 Lopetuskriteerien perusteella lopetettujen määrä: 11 Vakavimmat haitat liittyivät tutkimusmalliin tai leikkauksen jälkeen tapahtuneisiin hyvinvointiongelmiin, joiden syynä oli neuropaattinen kipu.	Kts. yhteenveto
osahanke 5 Kemoterapia-indusoitu polyneuropatia	Rotta + Hiiri	Kts. yhteenveto	Rotta: 279 Hiiri: 1774	Vakava-3, Kohtalainen-1666, Lievä-371, ei toipumista-10	Mallissa oli hyvin vähän hyvinvointiongelmia. Päivittäisen hyvinvointitarkkailun avulla yleiskunnon heikkeneminen havaittiin ajoissa.	Eläimen kunnon arvioinnissa on käytetty apuna mm. eläimen painon putoamista, liikkumiskykyä ja yleiskunnon kehittymistä.
Muutoslupa 1 Kylmä-indusoitu neuropaattinen kipu	Hiiri	Tutkimusmalli ei toiminut kuten odotettiin (-)	Hiiri: 18	Kohtalainen 12, lievä 6	Yksittäisessä kokeessa ei havaittu hyvinvointiongelmia.	

Muutoslupa 2 intrap- lantaari-in- jektio-malli (akuutti ki- pumalli)	Rotta + Hiiri	Kts. yhteenveto	Rotta: 570 Hiiri: 92	Vakava-0, Koh- talainen-364, Lievä-180, ei toi- pumista-118	Malli aiheutti eläimille kipua kä- pälän pohjaan, mutta sen etuna oli kivun akuutti luonne ja siitä johtuva hyvin lyhyt seuranta-aika: testit tehtiin kahden päivän sisällä, ja kipu lieventyi ja hävisi arvioiden mukaan muutaman tunnin kuluessa injektiosta.	Osa mallin kokeista pystyttiin to- teuttamaan terminaalianestesiassa ilman toipumista, jolloin eläimen kokema haitta jäi vähäiseksi.
---	------------------	-----------------	-------------------------	--	---	---

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	X	X	-
Riittävä koulutus ja perehdytys	X	X	X	-
Validaatiot ja pilotointi	X	X	-	-

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Imusuonten merkitys sydän- ja verisuonisairauksissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Imusuonet, lipoproteiiniaineenvaihdunta, ateroskleroosi	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Ei
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	Hankkeen tavoitteena on selvittää, miten imusuonten heiken- tynyt toiminta vaikuttaa lipoproteiiniaineenvaihduntaan sekä valtimokovettumataudin ja sydäninfarktin kehittymiseen. Tä- män lisäksi pyritään selvittämään, voidaanko imusuonten puu- toksesta aiheutuvia mahdollisia haittavaikutuksia hoitaa geeni- terapian avulla.	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Hankkeella voidaan saada merkittävää lisätietoa imusuonten merkityksestä lipoproteiinien aineenvaihdunnassa sekä valti- mokovettumataudin kehittymismekanismeista. Hankkeessa py- ritään kehittämään myös uusia hoitomuotoja.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri, 2830 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	Eläimille koituu haittaa paastotuksesta, näytteenotoista, kuvan- tamisista, tutkittavien aineiden annosteluista sekä kirurgisista operaatioista seuraavasta tautitilasta. Vakavuusluokat: kohtalainen	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Muuntogeenisillä hiirillä saadaan aikaan haluttu monimutkai- nen taudinkuva, jota olisi mahdotonta mallintaa muilla mene- telmillä.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	Tutkimuksessa käytetään sisäsiittoisia muuntogeenisiä hiirikan- toja, joiden perimä on lähes identtinen. Näin minimoidaan tu- lostojen hajonta. Tämän lisäksi kokeiden uusimisen tarvetta vä- hennetään pitämällä ryhmäkoot tarpeeksi suurina, jotta var- mistetaan luotettavien tulosten saaminen. Eläimistä määrite- tään ensin niiden perusaineenvaihduntaa ja sen jälkeen suori- tetaan hoitokokeet, jotta saadaan mahdollisimman laajasti tut- kimustuloksia aiheuttamatta kuitenkaan suurta kärsimystä.	
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on pa- ras tieteellisten tavoitteiden kan- nalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a ja b) Muuntogeeninen hiiri mallintaa hyvin ihmisen sairautta, koska sillä on kehittynyt monimutkainen sydän- ja verenkierto- elimistö. c) Eläimille aiheutettu haitta minimoidaan käyttämällä mahdol- lisimman ei-invasiivisia menetelmiä (esim. kuvantaminen) sekä käyttämällä tehokkaita anesteetteja ja kivunlievitystä. Turvo- tuksesta aiheutunut haitta pyritään minimoimaan käyttämällä	

	kokeissa mahdollisimman nuoria imusuonivajaatoimintaisia hiiriä. Turvotuksen kehittymistä seurataan pisteytyksen avulla (ks. Liite 2.), jolloin muutokset huomataan nopeasti. Kokeissa on käytössä lopetuskriteerit, joiden täytyessä eläin poistetaan kokeesta. Kaikki toimenpiteet toteutetaan koulutettujen henkilöiden toimesta, jolloin eläimille aiheutettu haitta on minimoitu.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 23.11.2020. Arviointi 25.11.2020 EK: OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Sepelvaltimotauti on yksi merkittävimmistä sydän- ja verisuonisairauksista länsimaissa ja siihen kuolee vuosittain yhä noin 10 000 suomalaista. Yleisin sepelvaltimotaudin aiheuttaja on valtimonkovettumatauti eli ateroskleroosi, jossa kolesterolia kertyy valtimoiden seinämiin. Tämän hankkeen tavoitteena oli selvittää imusuonten vajaatoiminnan merkitystä ateroskleroosin kehityksessä ja etenemisessä.

Imusuonistolla on todettu olevan merkittävä rooli rasvojen imeytymisessä ruoansulatuselimistössä, mutta yhteyttä verisuonisairauksien kehittymiseen ei oltu laajamittaisesti tutkittu. Ateroskleroosi ja sepelvaltimotauti voivat johtaa vaikeisiin komplikaatioihin kuten sydäninfarktiin, jossa äkillinen hapenpuute aiheuttaa vaurioita sydänlihaksessa. Hankkeessa pyrittiin myös selvittämään imusuoniston merkitystä sydäninfarktista palautumisessa, sydäninfarktia mallinnettiin hiirillä sydänlihaskemiaoperaatiolla.

Tässä hankkeessa käytettiin mm. muuntogeenisiä hiirikantoja, joille kehittyi ateroskleroosin lisäksi myös imusuoniston vajaatoiminta. Näissä hiirikannoissa myös veren rasva-arvojen suhteet on saatu muistuttamaan läheisesti ateroskleroosista kärsivän potilaan vastaavia arvoja, joten ne mallintavat hyvin ihmisen sairautta. Tämän lisäksi hiirillä on muutoksia imusuoniston kehityksen ja ylläpidon kannalta tärkeässä VEGFR3-geenissä, joten näillä hiirillä on vajavaisesti toimiva imusuonijärjestelmä.

Hankkeen tavoitteisiin päästiin hyvin, ja hanke oli osana kahta julkaistua väitöskirjaa ja hankkeen pohjalta julkaistiin myös tieteellinen julkaisu. Lisäksi hankkeen pohjalta on valmistumassa kaksi toistaiseksi julkaisematonta tieteellistä julkaisua ja kolmas väitöskirja. Hanke antoi siten merkittävää uutta tietoa imusuonten roolista ateroskleroosin kehityksessä ja imusuonten merkityksestä sydäninfarktista palautumisessa.

Sydän- ja verisuonitauteihin liittyvien kaikkien aspektien ja kudosten yhteisvaikutusten tutkimiseen tarvitaan kehittynyt verenkiertoelimistö. Muuntogeenisillä hiirillä saadaan aikaan haluttu monimutkainen taudinkuva, jota olisi mahdotonta toistaiseksi mallintaa muilla menetelmillä. Käytetyt muuntogeeniset hiirimallit, joiden rasva-arvoja saatiin muokattua lisää ruokavaliolla, mahdollistivat geenimuunnosten vaikutusten kokonaisvaltaisen tutkimisen, ja sydäninfarktia mallintavat hiiret antoivat merkittävää uutta tietoa sydäninfarktin kehityksestä heti infarktin jälkeen.

2. Millaista haittaa?

Akuutin sydäninfarktin mallintamiseen toivottiin kiinnitettävän erityisesti huomiota takautuvassa arvioinnissa. Sydänlihaskemiaoperaatiota käytettiin tässä tutkimuksessa mallintamaan ihmisen akuuttia sydäninfarktia ja siitä seuraavaa sydänlihaksen hapenpuutetta. Hiiret nukutettiin inhalatioanestesiolla ja sydänlihaskemia aiheutettiin ligatoimalla vasen laskeva sepelvaltimo pysyvästi (Gao et al., 2010 mukaan), mikä pysäyttää veren virtaamisen vasemman kammion kärkeen. Operaatio toteutettiin ilman intubaatiota rintaontelon läpi ja sen vuoksi se on toteutettava hyvin nopeasti (avanteen avaaminen ja sulkeminen ja niiden välissä tehtävä ligaatio kestää 30–40 sekuntia/eläin). Hiiret saivat kahta eri kipulääkettä heti operaation yhteydessä ja operaation jälkeisinä päivinä. Toinen kipulääkitys aloitettiin jo 30–45 min ennen operaatiota. Nopeasta operoinnista ja kipulääkityksestä huolimatta toimenpide on voinut aiheuttaa hiirille kohtalaista haittaa, joten toimenpiteen tosiasiallinen vakavuusluokka on kohtalainen.

Muissa luvalla olevissa toimenpiteissä eläimille aiheutettu tosiasiallinen haitta arvioitiin pääsääntöisesti lieväksi haitaksi (mm. metaboliakokeiden yhteydessä annetut injektiot, paastotukset ja verinäytteiden otot, sekä kuvantamiskerrat). Kun haitta näissä kokeissa arvioitiin kohtalaiseksi (mm. toimenpiteet, joihin kuului toistuvia verinäytteenottoja saman päivän aikana ja radioleimattujen partikkelien annostelua), kyseiset toimenpiteet olivat terminaalaisia eli koettu haitta oli vain lyhytkestoista. Toistuvissa verinäytteenotoissa eläimet voivat kuivua, joten useita verinäytteitä vaativien toimenpiteiden jälkeen hiirille annettiin lisänesteytystä ja/tai glukoosia. Yleisesti inhalationukutus oli hyvin siedetty ja eläimet heräsivät siitä nopeasti. Verinäytteenotossa käytettiin suositeltuja annosmääriä, lisäksi verinäytteenotoissa on nykyään paremmin huomioitu hiirten yleisvointi ja koko, eli verinäytettä ei oteta pieneltä tai huonovointiselta hiireltä.

Tiedetyn hyvinvointiongelman omaavien hiirikantojen ylläpitoeläimiä jouduttiin lopettamaan hyvinvointiongelman kehittyessä ja lopetuskriteerien täytyessä alle 10 (ylläpitoeläimiä tällä luvalla ollut noin 800). Eläintenhoitajien kanssa yhdessä kehitetty hyvinvointiongelman seurantataulukko on toiminut hyvin ja ylläpitohiiriä on käytetty tarkoitukseensa nuorena, jolloin ne on voitu lopettaa ennen hyvinvointiongelman kehittymistä kohtalaista haittaa aiheuttavaksi. Toimenpiteiden tosiasiallinen haitta vastasi melko hyvin arvioitua haittaa, eikä yllättäviä tapahtumia tullut.

3. 3R-mahdollisuudet

Hankelupa haettiin 2830 hiirelle, mutta luvalle lisättiin eläintietojärjestelmäämme neljän vuoden aikana vain 1435 hiirtä. Täten olemme voineet vähentää käytettyä hiirimäärää puoleen suunnitellusta 3R-periaatteiden mukaisesti. Tämä on tapahtunut käyttämällä tarkkaa suunnittelua paritusten ja tutkimusryhmien valitsemisessa, sekä maksimoimalla yhdestä hiirestä saatava informaatio. Yhteensä vakavuusluokitus on merkitty 726 hiirelle, eli tämä on tosiasiallinen haittaa kokenut eläinmäärä. Loput 705 ovat ylläpidon takia luvalle syntyneitä, mutta eivät ole kokeneet haittaa eikä niitä ole käytetty tutkimukseen. Haittaa kokeneista eläimistä vakiintuneen kannan ylläpitoon on käytetty 192 eläintä (joista GS3 160 kpl). Vakavaa haittaa ei kokenut yksikään eläin, kohtalaista haittaa 226, lievää 460 ja ei palautumista 40 eläintä. Kohtalaista haittaa kokeneista 5 oli löydetty kuolleena (kaikki sydäninfarktin jälkeen, kipulääkitys voimassa), lopetettu sairaana oli 6 hiirtä (GS3 hiiriä) ja loput oli lopetettu tutkimuskäytön päättyessä. Kohtalaista haittaa kokeneista valtaosa on käytetty sydäninfarkti- (117 kpl) ja geenihoito -kokeisiin (noin 10 kpl). Loput kohtalaista haittaa kokeneista on käytetty aineenvaihduntakokeisiin.

Eläinten käytön tilalle ei valitettavasti ole vielä tarjolla tarpeeksi kokonaisvaltaista mallia, joka vastaisi sydän- ja verisuonisairauksien tutkimustarpeisiin. Hankkeen aikana myös eläinten hyvinvointia on haluttu parantaa ja menetelmiä kehittää eri keinoin. Mm. akuuttia sydäninfarktia mallintavassa operaatiossa, joka tapahtuu inhalaatioanestesiassa (isofluraanilla, induktio 4 %, ylläpito 2–2,5 %) ja johon on luvalla merkitty kivunlievityksenä heti operaation jälkeen sekä Rimadyliä (karprofeeni 5 mg/kg) että Temgesiciä (buprenorfiini 0.05–0.1 mg/kg) ihon alle, siirryttiin ELLA:n suositusten mukaan antamaan Temgesiciä ihon alle jo 30-45 minuuttia ennen operaatiota, mikä oletettavasti vähensi hiirten kokemaa tuskaa lisäämättä kuitenkaan kuolleisuutta. Rimadyl annettiin yhä heti operaation jälkeen. Lisäksi molempia kipulääkityksiä annettiin kahtena operaation jälkeisenä päivänä, Rimadyliä 1 krt. päivässä ja Temgesic 2 krt. päivässä. Buprenorfiinin annostusta voisi edelleen kehittää antamalla sen ruokaan sekoitettuna (voluntary intake), tämän on osoitettu mahdollistavan pidempikestoisemmat ja vakaammat lääkeaineen plasmapitoisuudet ja lisäksi lääkeaineen anto aiheuttaa näin vähemmän stressiä. Tämä tulisi kyseeseen erityisesti pre-op. vaiheessa ja operointipäivän jälkeen. Tätä annostelutapaa tullaan pilotoimaan tutkimusryhmässämme jo voimassa olevilla hankeluvilla ja sen soveltuvuus tähän malliin arvioidaan myöhemmin.

Osa eläimistä ei selvinnyt sydäniskemiaoperaatiosta, vaan kuoli toimenpiteen aikana, mutta jos eläin selvisi operaatiosta, se pääsääntöisesti selvisi seurannan loppuun (sekä 8 päivän lyhytaikaisesti että 42 päivän pitkäaikaisseurannassa). Noin 10 % kuoli tai täytyi lopettaa operaation jälkeisinä päivinä. Tilastoinnin mukaan näistä 5 eläintä on löydetty kuolleena sydäniskeamiaoperaation jälkeen, loput on lopetettu Humane End Point -kriteerien täytyttyä (alle 10 hiirtä). Operoituja eläimiä seurataan operatiopäivänä ja sen jälkeisinä päivinä vähintään kolme kertaa päivässä (yleinen vointi ja aktiivisuus, kivun merkit). Kuolleena löydetyt eläimet ovat pääsääntöisesti kuolleet yöaikana, jolloin niitä ei ole voitu seurata. Jatkossa eläimiä on seurattava vielä tarkemmin ja sellaiset eläimet lopetettava herkemmin, joiden toipuminen operaation jälkeen on hidasta ja joiden ei uskota selviävän kokeen loppuun.

Kuolleisuuteen operaation aikana vaikuttaa suurelta osin hiiren taustakanta, eli ateroskleroositaustaisilla hiirillä (LDLRko/Apob100/100) kuolleisuus oli suurempaa (n. 40 %) kuin C57BL-taustaisilla hiirillä (n. 20 %), todennäköisesti koska ateroskleroositaustaisten hiirten suurempi rasvaprosentti pidentää operaation kestoa ja aiheuttaa sydämelle lisärasitusta. Operaation jälkeen paranemisvaiheessa kuolleet hiiret olivat lähinnä imusuonipuutteisia hiiriä (90 % kuolleista oli imusuonipuutteisia), mikä liittyy tutkimuskysymykseen ja tutkimustulokseen, eli imusuonipuutteiset hiiret paranevat sydäninfarktista huonommin, ei itse toimenpiteen toteutukseen. Temgesic-kipulääkityksen aloittaminen ennen operaatiota ei merkittävästi vaikuttanut kuolleisuuteen.

Käyttämämme hiirimäärät olivat vain puolet hankeluvalla merkityistä eläinmääristä, joten olemme uudelle hankeluvalla vähentäneet hankkeessa tarvittavien hiirten määrää. Hiirimäärän vähenemisen mahdollisti mm. se, että keräämme mahdollisimman paljon dataa per hiiri tehokkaasti myös non-invasiivisilla menetelmillä, kuten kuvantamalla.

Muuta

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Tiedetyn hyvinvointiongelman omaavien hiirikantojen ylläpito	hiiri	+	Luvassa arvioitu määrä 540 / tosiasiallinen määrä haitallisen genotyypin omaavia hiiriä 160.	Luvassa arvioitu: lievä / Tosiasiallinen: lievä 159, kohtalainen 1.	Vakavin haitta kohtalainen, satunnainen. Pääasiassa vain käytetystä hiirimallista aiheutuvaa lievää haittaa.	Tosiasiallinen määrä voi olla hieman alakanttiin tilastointitavasta johtuen: jos eläintä on käytetty sekä tutkimukseen että ylläpitoon, on se kuitenkin ensisijaisesti tilastoitu tutkimuskäyttötarkoituksella. Eläinten haitallisen fenotyypin seuraamiseksi on luotu yhdessä eläintenhoitajien kanssa pisteytystaulukko, joka helpottaa oireiden kehittymisen seuraamista iän myötä. Eläimet lopetettiin pääsääntöisesti hyvissä ajoin siten, että eläimen kokema haitta jäi lieväksi.
Metaboliatutkimus ja imusuonitointoonliittyvä perustutkimus	hiiri	+	Luvassa arvioitu määrä 480/ tosiasiallinen määrä 400.	Luvassa arvioitu: lievä ja kohtalainen / tosiasiallinen: lievä ja kohtalainen.	Pääsääntöisesti aiheutunut haitta oli lievää. Vakavin aiheutunut haitta oli kohtalaista, sitä aiheuttivat aineenvaihduntakokeet olivat lyhytkestoisia ja terminaalisia.	Toistuvissa verinäytteenotoissa eläimet voivat kuivua, joten useita verinäytteitä vaativien toimenpiteiden loputtua hiirille annettiin lisänesteytystä ja/tai glukosia. Verinäytteenotossa käytettiin suositeltuja annosmääriä, lisäksi verinäytteenotoissa on nykyään paremmin huomioitu hiirten yleisvointi ja koko, eli verinäytettä ei oteta pieneltä tai huonovointiselta hiireltä. Toimenpiteet, joista arvioitiin aiheutuneen kohtalaista haittaa, olivat kuitenkin lyhytkestoisia ja terminaalisia.

Sydäninfarktitutkimus	hiiri	+	Arvioitu määrä 200/tosiasiallinen määrä 120.	Luvassa arvioitu: kohtalainen, tosiasiallinen: kohtalainen.	Sydänlihaskemia aiheuttaa kohtalaista haittaa, vaikka tutkimuksessa käytetään tehokasta kipulääkitystä.	Hankkeessa käytettiin tehokkaampaa kipulääkitystä kuin mitä hakemuksessa alun perin kuvailtiin. Ennen sydänoperointia annosteltavien kipulääkitysten ajateltiin lisäävän eläinten kuolleisuutta, joten luvassa kuvattiin kipulääkitys annettavaksi vasta operoinnin yhteydessä eläimen ollessa anestesiassa. Tästä huolimatta koe toteutettiin siten, että nopeavaikutteinen kipulääkitys annettiin 30–45 min ennen varsinaista operointia ja sen annostuskertoja lisättiin myös postoperatiivisessa hoidossa ja vain hitaampivaikutteinen ja pitkäkestoinen kipulääkitys annettiin operoinnin yhteydessä. Kuolleisuus ei lisääntynyt, mutta kipulääkityksen tehokkuus parani. Myös eläinten postoperatiivinen tarkkailu tehostui, kun eläinten päivittäiset tarkastelut lisääntyivät kipulääkityskertojen lisääntymisen vuoksi.
-----------------------	-------	---	--	---	---	--

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	X	-	X
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Aikaistettu kipulääkitys	X	X	-	X
Lisänesteytys	X	X	-	X

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Keskushermoston suojaus sydän- ja aorttakirurgiassa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Sydän, keskushermosto, sydänkirurgia, suojaus, sydänkeuhkokone	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Vaikeiden synnynnäisten sydänvikojen, aortan kaaren sekä laskevan aortan korjauksissa joudutaan joskus pysäyttämään tai heikentämään aivojen tai selkäytimen verenkiertoa. Tähän liittyy huomattavien neurologisten komplikaatioiden vaara. Laskeamalla keskushermoston lämpötilaa voidaan aineenvaihduntaa ja hapenkulutusta voidaan vähentää. Usein monimutkaiset aortan kaaren korjausleikkaukset vaativat kuitenkin pidemmän ajan mihin pelkkä lämpötilan lasku antaisi suojan, joten tutkimuksillamme pyrimme löytämään keinoja pidentää hypotermisen verenkierron pysäytyksen turvallista aikaa. Olemme laajentaneet tutkimuksiamme niin, että pyrimme tutkimaan ja löytämään keinoja myös selkäytimen ja sydämen suojaukseen. Laskevan rinta-aortan ja vatsa-aortan korjausleikkauksien pelätyin komplikaatio on alaraajojen halvaantuminen.</p> <p>Tutkimustemme tavoitteena on kehittää aivojen, selkäytimen ja sydämen suojaamiseen käytettäviä uusia menetelmiä, joilla voidaan vähentää vaativaan sydänkirurgiaan liittyviä komplikaatioita. Lisäksi tutkimme iskemia-reperfuusioaurion mekanismeja ja pyrimme lieventämään siitä aiheutuvia haittoja. Iskemia-reperfuusioauriolla tarkoitetaan niitä haitallisia solutason tapahtumia, jotka syntyvät verenkierron palautuksen jälkeen ja pahentavat jo verenkierron- tai hapenpuutteen jo aiheuttamaa soluvauriota. Iskemia-reperfuusioaurio aiheuttaa merkittäviä kudus- ja soluvaurioita verenkierron palautumisen jälkeen.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tutkimustuloksemme ovat siirrettävissä helposti ihmistutkimuksiin ja sitä kautta käytäntöön potilaiden hoidossa. Paremmat keskushermoston suojausmenetelmät vähentävät operatioihin joutuvien potilaiden neurologisia komplikaatioita, inhimillistä kärsimystä ja hoitokustannuksia.	
Käytettävät eläinlajit ja eläin- määrät	Sika, 270	

Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	<p>Eläimille aiheutuu haittaa sydämeen kohdistuvasta kirurgisesta toimenpiteestä ja siitä seuraavista motorisista häiriöistä. Porsaat lopetetaan toimenpiteen ja/tai seurannan jälkeen.</p> <p>Vakavuusluokat: Ei toipumista, vakava</p>
3R-menettelmien soveltaminen - Application of the 3Rs	
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	<p>Tutkimuksessa ei voida hyödyntää eläinkokeettomia menetelmiä, johtuen tutkimusmallin monimutkaisuudesta. Porsasmalli on sekä verenkiertoelimistön fysiologialta että anatomialta hyvin samankaltainen ihmisen kanssa. Tämä mahdollistaa tutkimustulosten siirrettävyyden klinisiin tutkimuksiin ja käytäntöön.</p>
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	<p>Aikaisempien tutkimustemme perusteella olemme laskeneet (power analysis) tarvittavien koe-eläinten määrät kussakin koesarjassa tilastotieteen menetelmin. Suunnittelemme ja toteutamme sarjat vähäisimmällä määrällä eläimiä, millä on vielä mahdollista saada tilastollista merkitsevyyttä ja voimaa tuloksiin.</p>
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	<p>Porsaan verenkiertoelimistön anatomia ja fysiologia ovat hyvin lähellä ihmisen vastaavia. Eläinmalli on paras, koska tulokset ovat helposti sovellettavissa käytännön potilashoitoon. Käyttämässämme koe-eläinmallissa pyrimme huomioimaan kaikin mahdollisin tavoin eläimen hyvinvoinnin. Esilääke annetaan jatkoletkun ja neulan avulla porsaan niskaan eläimen ollessa vapaana karsinassa. Pitkä jatkoletku mahdollistaa sen, että porsas saa liikkua vapaasti injektioaikana. Tällöin injektio voidaan myös antaa hitaammin, mikä vähentää yksittäisen lihakseen annosteltavan injektion kivuliaisuutta. Yleisanestesiassa eläimiä hoidetaan kuten ihmispotilaita ja leikkauksen jälkeinen kipulääkitys on riittävää ja runsasta hyvien hoitokäytäntöjen mukaisesti.</p> <p>Eläimen heräämisen jälkeen toipumista heräämössä seuraa läpi yön aina tutkija. Porsas siirretään omaan karsinaan vasta kun se on kunnolla herännyt. Tarvittaessa käytetään ylimääräistä lämpölähdettä. Porsaiden alla pidetään pehmustetta makuuvam- mojen välttämiseksi.</p> <p>Tutkijat tarkastavat eläimen tilanteen joka päivä koe-eläin-keskuksen eläintenhoitajien ohella ja mahdollisiin ongelmiin puututaan välittömästi. Kipulääkityksestä huolehditaan koko seurantaajan ajan. Sioille tehdään joka päivä myös postoperatiivisen tilan arviointi ja pisteytys. Koe-eläinlaitoksen eläinlääkäri seuraa eläinten hyvinvointia ja on käytettävissä aina tarvittaessa.</p>
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 26.2.2021. Arviointi EK 26.2.2021: OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Vaikeiden synnynäisten sydänvikojen, aortan kaaren sekä laskevan aortan korjauksissa joudutaan joskus pysäyttämään tai heikentämään aivojen tai selkäytimen verenkiertoa. Tähän liittyy huomattavien neurologisten komplikaatioiden vaara. Laskemalla keskushermoston lämpötilaa voidaan aineenvaihduntaa ja hapenkulutusta voidaan vähentää. Usein monimutkaiset aortan kaaren korjausleikkaukset vaativat kuitenkin pidemmän ajan mihin pelkkä lämpötilan lasku antaisi suojan, joten tutkimuksillamme pyrimme löytämään keinoja pidentää hypotermisen verenkierron pysäytyksen turvallista aikaa. Olemme laajentaneet tutkimuksiamme niin, että pyrimme tutkimaan ja löytämään keinoja myös selkäytimen ja sydämen suojaukseen. Laskevan rinta-aortan ja vatsa-aortan korjausleikkauksien pelätyin komplikaatio on alaraajojen halvaantuminen.

Tutkimustemme tavoitteena on kehittää aivojen, selkäytimen ja sydämen suojaamiseen käytettäviä uusia menetelmiä, joilla voidaan vähentää vaativaan sydänkirurgiaan liittyviä komplikaatioita. Lisäksi tutkimme iskemia-reperfuusioaurion mekanismeja ja pyrimme lieventämään siitä aiheutuvia haittoja. Iskemia-reperfuusioauriolla tarkoitetaan niitä haitallisia solutason tapahtumia, jotka syntyvät verenkierron palautuksen jälkeen ja pahentavat jo verenkierron- tai hapenpuutteen jo aiheuttamaa soluvauriota. Iskemiareperfuusioaurio aiheuttaa merkittäviä kudosis- ja soluvaurioita verenkierron palautumisen jälkeen

Osahanke 1: Esialtistavan raajaiskemian käyttö selkäytimen suojauksessa. Krooninen sarja (sisältäen myös muutosluvan)

Tavoitteena oli selvittää, että vähentääkö esialtistavan raajaiskemian käyttö alaraajojen halvaantumista laskevan rinta-aortan korjausleikkauksen yhteydessä. Ensin ilman aortansulkua ja sitten 25min aortan sulun jälkeen. Totesimme suotuisan vaikutuksen post-operatiivisessa paranemisessa, tavoitteessa siis onnistuttiin. Käytetty koe-eläinmalli sopi erinomaisesti tarkoitukseen.

Osahanke 2: HIF-mimeetin käyttö sydämen suojaamiseen. Akuutti sarja

Tavoitteena oli selvittää lääkkeellisen HIF-mimeetin vaikutuksia sydämen suojaamisen vasemman kiertävän sepelvaltimon sulun aikana. Tutkimus oli akuutti eikä sikoja herätetty, sillä tutkimme vain akuutin kudosisvaurion muodostumista. Totesimme tutkimuksessa suotuisan vaikutuksen, käytetty eläinmalli oli sopiva tarkoitukseen.

Osahanke 3: Q10-arvon määrittäminen ja esialtistava raajaiskemian käyttö. Akuutti sarja

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, että lisääkö esialtistava raajaiskemian turvallista hypotermisen verenkierron seisautuksen kestoa laskemalla aivojen aineenvaihduntaa eri lämpötiloissa. Kyseessä oli akuutti malli, jossa siat olivat terminaalianestesiassa. Tutkimuksessa todettiin suotuisa vaikutus, akuutti malli oli tähän tilanteeseen sovelias.

Osahanke 4: Intermittivoivan hypotermisen verenkierron pysäytyksen käyttö keskushermoston ja sydämen suojauksessa

Tämän osahankkeen alla tehtiin lopulta kaksi eri tutkimusta, ensin intermittivoivan hypotermisen verenkierron pysäytyksen kautta ja toiseksi teimme osahankkeen 3 kroonisen mallin, jossa

laskettiin Q10-arvoa ja selvitettiin myös neurologista toipumista. Totesimme molemmissa tutkimuksissa suotuisat vaikutukset. Krooniset mallit olivat elintärkeitä neurologisen toipumisen selvittämiseksi.

Osahanke 5: Esialistivan raajaiskemian ja selektiivisen aivoperfuusion käyttö selkäytimen suojauksessa. Krooninen sarja.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, että suojaako esialistava raajaiskemia selektiiviseen aivoperfuusion liittyvältä selkäytimen hapenpuutteelta. Suojausvaikutukset jäivät lopulta vähäiseksi, mutta saimme elintärkeää tietoa selkäytimen ja viskeraalinelinten kyvystä sietää lievässä hypotermiassa tapahtuvaa hapenpuutetta. Krooninen malli oli tähän tarkoitukseen sopiva.

2. Millaista haittaa?

Osahankkeet 1, 4 ja 5 olivat haittaluokaltaan vakavia, osahankkeissa 2 ja 3 oli terminaalianestesia, joten haittaluokka on ei toipumista.

Osahankkeissa 1 ja 5 haittaluokka oli vakava. Porsaat saivat selkäydinvaurioita, joiden seurauksena liikkuminen ja virtsaaminen vaikeutuivat, sen vuoksi virtsakatetri asetettiin vatsanpeitteiden läpi jo operaation aikana. Tosiasiallinen haitta oli oletetun kaltainen ja tutkimuksen kannalta tärkeä. Lopetuskriteereihin jouduttiin turvautumaan osahankkeen 1 kohdalla kuudesti ja osahankkeen 5 kohdalla 12 kertaa. Tämä tulos ei varsinaisesti yllättänyt.

Osahankkeessa 4 haittaluokka oli myös vakava, mutta löydökset olivat huomattavasti miedompia kuin osahankkeissa 1 ja 5. Ensimmäisessä tutkimuksessa kaikki porsaat toipuivat kohtalaisen nopeasti, lievää hidastuneisuutta ja sekavuutta lukuun ottamatta, yhtäkään sikaa ei tarvinnut lopettaa kriteerien perusteella ennen aikaisesti. Toisessa osassa tutkimusta esiintyi kaksi aivoinfarktia, myös syöminen ja juominen olivat osalla sioista huonompia. Lopetuskriteereihin jouduttiin turvautumaan kolmen sian kohdalla. Yllätyksiä ei tullut.

3. 3R-mahdollisuudet

Vaihtoehtoisia menetelmiä tälle tutkimukselle ei ole, sillä tutkimuksemme ovat ns. prekliinisiä tutkimuksia, joissa tutkimme pienillä koe-eläimillä aiemmin todettuja menetelmiä ennen kuin niitä voidaan siirtää ihmistutkimuksiin. Ilman tätä väliporrasta ihmiset voisivat altistua tarpeettomille hoitomenetelmille. Toimenpiteiden toteuttamistapaa olemme koko ajan kehittäneet 20 vuoden aikana sujuvammaksi ja vähemmän vahingoittavaksi, avoleikkaukset on edelleen tehtävä, jotta pystymme vastaamaan ihmisille tehtäviä toimenpiteitä. Inhimillisiä lopetuspisteitä ei voi tästä enää juurikaan aikaistaa, sillä meidän on nähtävä kliinisesti, että millaisia vaurioita hapenpuute aiheuttaa ja myös saada kudosvauriosta patologinen analyysi. Kudosvaurion kehittymiseen menee kuitenkin aikaa. Tutkimusryhmien välille on saatava eroja, ja toimenpiteiden tulee aiheuttaa palautumattomia vaurioita, jotta vertailu ryhmien välillä on mahdollista. Eläinmäärät ovat tällä hetkellä niin minimaaliset kuin tilastollisesti voidaan toteuttaa. Nykyinen eläinmääräkin altistaa osittain tyyppin 2 tilastolliselle virheelle, sillä näin vähällä eläinmäärällä ei ole helppoa saavuttaa tilastollista merkitsevyyttä ryhmien välillä. Olemme maksimoineet eläimistä saatavan hyödyn ottamalla useita kudoksenäytteitä sekä verinäytteitä, joita voidaan hyödyntää myös jälkikäteen.

Muuta

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
1	sika	+	120/53	vakava/vakava	toistuva, mallista aiheutuva selkäydinvaurio eri asteisena	Haittaa vähennettiin virtsaketetrilla, toistuvilla syötöillä, nesteytyksellä, pehmeillä patjoilla.
2	sika	+	45/19	ei toipumista/ei toipumista	Ainoa haitta on esilääkepistos	Eläinmääriä ei voida enää tästä vähentää tai hyvinvointia parantaa.
3	sika	+	70/22	ei toipumista/ei toipumista	Ainoa haitta on esilääkepistos	Eläinmääriä ei voida enää tästä vähentää tai hyvinvointia parantaa.
4	sika	+	80/55	vakava/vakava	aivoinfarktin aiheuttama liikkumisongelma, mallista johtuva.	Eläinmääriä voitiin vähentää kirurgisella taidolla, jolloin eläimiä ei mene hukkaan, lisäksi hypotermisen verenkierron pysäytyksen aika oli sopiva vaurioiden kannalta.
5	sika	+	90/36	vakava/vakava	Selkäydinvauriosta johtuva alaraajojen liikkumattomuus, virtsaumpi. Mallista johtuvaa.	Virtsakatetri, nesteytys, syötöt, pehmeä patja, tarkka seuranta. Eläinmäärää vähennettiin kirurgisella taidolla, mikä vähensi eläinhukkaa.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	-	-	x	-
Lyhyempi seuranta-aika	-	-	x	-
Pesämateriaali	X	X	X	-
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	-
Totuttaminen	X	X	x	-

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Sydämen vajaatoimintamallit uusien lääkeaineiden kehityksessä	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Sepelvaltimotauti, verenpainetauti, sydäninfarkti, vajaatoiminta	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolli- set tarpeet)	Tässä tutkimushankkeessa tutkitaan uusia lääkkeellisiä hoitomuotoja sydämen vajaatoiminnan hoitoon. Infarktinjälkeistä sydänlihaksen rajallista paranemiskykyä (regeneraatio) yritetään lisätä ja sydänlihaksen haitallista uudismuovautumista estää. Tavoitteena on infarktinjälkeisen vaurion korjaantuminen ja sydämen pump- pausominaisuuksien palauttaminen elimistön verenkierron kan- nalta riittävälle tasolle.	
Hankkeesta saatava mahdolli- nen hyöty (kuinka tiede edis- tyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tu- loksista)	Sydän- ja verisuonitaudit ovat maailmanlaajuisesti merkittävän kuolinsyy. Uusien hoitomuotojen myötä sydämen vajaatoimintaa sairastavien elämänlaatu paranee ja kuolleisuus pienenee.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 1890, rotta 700 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, ar- vioidut vakavuusluokat, eläin- ten kohtalo toimenpiteen pää- tyyttyä	<p>Sydämen vajaatoiminnan aiheuttaminen saattaa aiheuttaa eläi- melle tautiin liittyviä haittoja kuten fyysisen suorituskyvyn rajoit- tuneisuutta, hengenahdistusta ja mahdollisen äkkikuoleman. Eläi- melle aiheutuu haittaa myös toistuvista lääkeaineiden annoste- luista, kuvantamisista sekä fyysisen suorituskyvyn mittauksista.</p> <p>Vakavuusluokat: vakava</p>	
3R-menettelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi kor- vaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Uusien lääkemolekyylien tehoa ja turvallisuutta tutkitaan myös soluviljelmillä (esim. hiPS kardiomyosyytit), mutta lopullinen tehon ja turvallisuuden arviointi vaatii kuitenkin lääkeaineiden tes- taamista elävässä eläimessä.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisim- man vähän?	Koe-asetelmat ja tutkimusryhmät on suunniteltu siten, että tutki- muksesta saatava hyöty olisi mahdollisimman suuri pienimmällä mahdollisella eläinmäärällä.	
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valin- nalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta?	Vakiintuneet tutkimusmenetelmät suosivat hiiren ja rotan käyt- tää tutkimusmallina. Valittu eläinmalli kuvastaa ihmisen tautitilaa hyvin ja mahdollistaa tulosten tarkastelun parhaalla mahdollisella tavalla. Eläimille aiheutuvaa haittaa minimoidaan hyvillä aneste- sia- ja kivunhoitokäytännöillä ja minimoimalla eläimille tehtävät toimenpiteet.	

c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 27.1.2021. Arviointi EKaliste 29.1.2021 OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeiden tavoitteena oli selvittää sydämen regeneraatiomekanismeja sydäninfarktin tai kohonneen verenpaineen aiheuttamien vaurioiden seurauksena. Tavoitteissa on onnistuttu hyvin. Uutta, merkittävää tietoa sydänlihaksen kasvu- ja toipumismekanismeista on saatu. Eläimallit, erityisesti osahankkeen 1 neonaalihilirimalli on erityisen tarkoituksenmukainen. Kohonneen verenpaineen vaikutusta sydämeen ei kuitenkaan voida tutkia osahankkeen 1 mallilla, jolloin tarvitaan myös muita eläinmalleja.

2. Millaista haittaa?

Tutkimusten haitat eläimille olivat vakavuudeltaan ja tyypiltään odotettuja ja analyysit keskittyivät juurikin esiin tulleiden haittojen syntymekanismeihin. Sydäninfarkti tai aortan kiristys ovat selkeästi haitallisia eläimille mutta hyvän kipulääkityksen ansiosta eläimen kokema haittaa pyritään minimoimaan. Lisäksi hyvä kivunhoito, jolla pyritään minimoimaan eläimen kokema stressi, antaa luotettavimmat tulokset eri analyysiin ja siten vähentää tutkimuksissa tarvittavien eläinten määriä. Kokonaisuudessaan 39 eläintä löytyi kuolleen aamutarkastuksessa / jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella.

3. 3R-mahdollisuudet

Käytettävien eläinten määrää on pystytty pienentämään mittausdatan ja kudoksenäytteiden kerääntyessä, jolloin vanhemmat analyysit ja näytteet voivat toimia taustadatanäytteinä uudemmille tutkimuksille. Lisäksi jatkuvasti kehittyvät analyysimenetelmät vaativat pienempää määrää näyttemateriaalia. Kohonneen verenpaineen ja mekaanisen rasituksen vaikutusta sydänsoluihin ja erityisesti koko sydämeen voidaan edelleen luotettavasti tutkia vain eläinmalleissa, joskin hyviä In Vitro -menetelmiä, kuten hiljattain käyttöönottamamme "Flexercell", on kehitetty. Sydäninfarktin kokonaisvaikutus sydämeen ja sydänsoluihin ei tule ilmi In Vitro -malleissa. Yksittäisiä infarktin komponentteja, kuten hapenpuutetta ja haitallisten välittäjäaineiden vaikutusta voidaan, tietyin rajoituksin, tutkia myös In Vitro. Hankkeeseen myönnettyä maksimieläinmäärää ei tule muuttaa. Käytettyjen eläinten lukumäärä pidetään joka tapauksessa mahdollisimman pienenä. Eläinmäärää vähenee datan ja tutkimusmateriaalin kasvun kautta. Dataa ja materiaalia voidaan myös jakaa tutkimusyhteistyötahoille, jolloin tietystä eläinmäärästä saadaan enemmän ja kokonaisvaltaisemmin tietoa.

Muuta

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
OSAHANKE 1	Hiiri	+	630/439 (Sis. operoimattomat kontrollit)	SV4/ NB-SV4 (SV4 infarkti, NB täysin naivi kontrolli)	Anestesian aikainen kuoleminen. Satunnaista.	Eläinmäärien tarve pienentyy tutkimustiedon lisääntyessä. Operaatorutiinien parantuessa poikasten kuolleisuus on vähentynyt.
OSAHANKE 2	Hiiri	+	630 / 95 Operoitua+ kontrollit	SV4/ NB-SV4 (SV4 infarkti, NB täysin naivi kontrolli)	Anestesian aikainen kuoleminen. Eläin löytynyt kuolleena häkistä seuraavana aamuna Satunnaista.	Eläinmäärien tarve on pienentynyt tutkimustiedon lisääntyessä. Kudosta / plasmaa / RNAta on kerääntynyt pankkiin.
	Rotta	+	100 / 56 operoitua + erilaiset kontrollit	SV4/NB-SV3 (SV3 infarkti, NB täysin naivi kontrolli)	Anestesian aikainen kuoleminen. Eläin löytynyt kuolleena häkistä seuraavana aamuna Satunnaista.	Eläinmäärien tarve on pienentynyt tutkimustiedon lisääntyessä. Kudosta / plasmaa / RNAta on kerääntynyt pankkiin.
OSAHANKE 3	Hiiri	+	630 / 51 operoitua + kontrollit	SV4/NB-SV3 (SV3 operoitu, NB täysin naivi kontrolli)	Eläin löytynyt kuolleena häkistä seuraavana aamuna Satunnaista ja harvinaista.	Eläinmäärien tarve on pienentynyt tutkimustiedon lisääntyessä. Kudosta / plasmaa / RNAta on kerääntynyt pankkiin. Eläinten kanssa töitä tekevien ammattitaito on kasvanut ja eläintilat parantuvat jatkuvasti.
	Rotta		100 / 0	--	-	-
OSAHANKE 4	Rotta	+	500 / 169	SV4 / SV1	Eläimille ei tehty mitään anestesiaa, puudutusta tai kipulääkitystä vaativaa toimenpidettä. Osa eläimistä kuoli seuranta-aikana ravinnon ja perimän aiheuttaman kohonneen verenpaineen komplikaatioihin.	Koska kokeessa oleville eläimille kehittyy spontaanisti verenpainetauti komplikaatioineen, tärkeintä on lopettaa eläin ajoissa heti lopetuskriteerien täytyessä.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Oma kudος / plasma / RNA pankki	X	X	-	-
Jatkuvasti kasvavien yleisesti saatavilla olevien tietokantojen hyödyntäminen taustadatana sekä tautispesifisenä vertailudatana.	x	x	x	X

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ

Hankkeen nimi	Lääkeaineiden tehon testaaminen Battenin taudin prekliinissä eläinmallissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	hiiri, prekliininen lääkeainetutkimus, lysosomaalinen hermorappeumasairaus	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Battenin taudin hoitoon ei ole olemassa tehokkaita lääkeai- neita. Battenin tauti aiheuttaa potilaille ja heidän omaisilleen huomattavaa kärsimystä. Battenin taudilla on monia muotoja, kuten infantiili, juveniili ja aikuismuotoja, jotka aiheutuvat lyso- somaalisten entsyymien geneettisistä mutaatioista ja ovat va- kavimmillaan kuolemaan johtavia.</p> <p>Tämän hankkeen tavoitteena on edesauttaa potentiaalisten lääkeaineiden etenemistä kliinisiin kokeisiin. Sairaus ja sen muodot kuuluvat harvinaisiin yhden geenin sairauksiin.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tavoitteena on kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Batte- nin taudin hoitoon. Tutkimusmallien käyttö edistää myös Batte- nin taudin mekanismien tutkimista, mikä edesauttaa uusien lääkkeiden ja lääkehoitomuotojen kehittämistä.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 2700 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	<p>Cln6 ja Cln8 geenimuunnelluilla hiirillä esiintyy neurologisia oi- reita 4-8 kuukauden iästä alkaen, johtaen heikentyneeseen mo- toriikkaan ja koordinaatioon. Cln2^{R207X} linja taas on selvästi progressiivisempi ja neurologiset oireet ovat myös selvästi voi- makkaampia taudin edetessä. Haittaa aiheutuu myös tutkitta- vien aineiden toistuvista annosteluista, verinäytteenotosta, motoriikkaa mittaavista testeistä ja kuvantamisista. Tutkimuk- sen päätteeksi eläimet lopetetaan.</p> <p>Vakavuusluokat: vakava</p>	
3R-menettelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	In vitro -mallit Battenin taudin tutkimiseksi ovat hyvin rajalliset. Uusien lääkkeiden todellista tehoa tai vastetta sekä turvalli- suutta voidaan tutkia luotettavasti vain koe-eläinmalleissa en- nen kliinisiä kokeita.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	Koeasetelmat on standardoitu ja niiden käytön pohjana on perusteellinen mallien validointityö. Validointityöllä varmistee- taan, että koe-eläinmalli käyttäytyy mallille kuuluvalla tavalla ja antaa oikeanlaisen tautivasteen. Koeasetelmissa ryhmän	

	sisäinen variaatio minimoidaan mallivalidaatiotyöllä, joka määrittelee tilastollisesti tarvittavat ryhmäkoot (voima-analyysi). Battenin taudin mallit ovat kirjallisuudessa hyvin kuvattuja ja siksi hyvin ennustettavia.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	Suurin osa Battenin taudin sairauksien eläinmalleista on kehitetty jyr-sijöissä. Käytössä on myös lammasta- ja sikamalleja. Kyseiset tutkittavat kannat ovat Battenin taudin eri geenien poistogeenisiä hiirikantoja, jotka vaikuttavat ihmisaikautuksessa. Jyr-sijöissä havaitut taudin mekanismit, vasteet nykyisille hyvin rajallisille lääkkeille ja eläinten käytön määrä suhteessa saatavaan informaatioon lääkeaineen tehosta ja turvallisuudesta ovat hyvät. Haittaa pyritään minimoimaan eläinten huolellisessa seurannalla ja mahdollisimman aikaisilla lopetuskriteereillä.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 25.3.2020. Arviointi EK 7.6.2020 – OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli validoida käytettävät tutkimusmallit ja kehittää uusia tehokkaita hoitomuotoja Battenin ja Hunterin (muutoslupa) tautien hoitoon testaamalla lääkeaineiden tehoa näiden eläinmalleissa. Tutkimuksen tarkoituksena oli testata uusia lääkeaineita, jotka mahdollisesti estävät näiden tautien kehittymistä ja lieventävät siihen liittyviä funktionaalisia häiriöitä ja patologisia muutoksia ja lisäävät elinaikaa. Hanke koostui varsinaisen luvan alla tehdyistä tutkimuksista ja kolmesta muutosluvasta. Kahteen muutoslupaan liittyen tutkimuksia ei kuitenkaan suoritettu.

HANKE – Lääkeaineiden tehon testaaminen Battenin taudin prekliinisessä eläinmallissa. Battenin taudin tutkimuksissa käytettiin kolmea eri geenimuunneltua hiirikantaa (Cln6, Cln2R207X, Cln8), joille kehittyy ikääntyessä progressiivisesti etenevä neurologinen tila. Hiirikannoissa havaitaan progressiivisesti etenevä halvaantumisoireiden eteneminen. Osalla kannoista oireet ovat vakavampia kuin toisissa kannoissa. Hankkeessa ei suoritettu yhtään varsinaista lääkeainetutkimusta vaan pelkästään kolme validaatiotutkimusta. Koeasetelmissa eläimiltä otettiin verinäytteitä ja niille suoritettiin MRI/SPECT/PET-mittauksia ja käyttäytymistestejä. Hiirillä havaittiin etenevää raajojen toiminnan heikentymistä, osittaista ja lopulta täydellistä takaraajojen halvaantumista. Eläimet lopetettiin lopetuskriteerien täytyessä tai kokeen lopussa. Malli toimii hyvin ja validaatiotutkimusten tavoitteet saavutettiin.

Muutoslupa – Gaucherin tauti. Tutkimuksia ei tehty.

Muutoslupa – Niemann-Pickin oireyhtymä. Tutkimuksia ei tehty.

Muutoslupa – Hunterin tauti. Seurantajakson aikana eläimille annosteltiin tutkimuslääkkeitä, eläimiltä otettiin verinäytteitä ja eläimille suoritettiin käyttäytymistestejä. Malli toimii hyvin ja lääkeainetutkimuksen tavoitteet saavutettiin.

2. Millaista haittaa?

Varsinaisessa hankkeessa käytettiin yhteensä 127 hiirtä kolmessa eri tutkimuksessa. Näistä transgeenisia

eläimiä oli 63 kpl. Tutkimuksissa kaikista hiiristä 43 kpl eli 34 % kuului vakavuusluokaltaan vakavimpaan luokkaan ja 29 eli 23% lopetettiin lopetuskriteerien perusteella. Kohtalaiseen luokkaan kuului 20 kpl eli % 16% ja lievään luokkaan 64 kpl eli 50%. Kokeen tosiasiallinen vakavuusluokka oli vakava, kuten luvassa etukäteen ennakoitiin. Vakavuus johtui mallista ja oli odotettavaa. Oireet olivat halvaantumistyyppisiä oireita.

Muutoslupa – Gaucherin tauti. Tutkimuksia ei tehty

Muutoslupa – Niemann-Pickin oireyhtymä. Tutkimuksia ei tehty

Muutoslupa – Hunterin tauti. Muutosluvan alla tehtiin yksi tutkimus, jossa oli yhteensä 23 hiirtä. Eläimille aiheutui korkeintaan lievää haittaa tutkimusmenetelmistä ohtuen (lääkintä, verinäytteet ja käyttäytymistestit). Itse tutkittavassa kannassa ei havaittu hyvinvointiongelmia. Eläimiä ei jouduttu lopettamaan tutkimuksen aikana, eikä eläimiä löydetty kuolleena.

3. 3R-mahdollisuudet

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Päälupa	Hiiri	Tutkimusmalli toimi hyvin ja antoi luotettavia tuloksia (+). Validaatiotutkimukset onnistuivat suunnitelmien mukaisesti (+).	2700 hiirtä / 127 hiirtä	Vakava / 43 kpl vakava, 20 kpl kohtalainen, 64 kpl lievä, ei toipumista 0 kpl	Vakavin haitta oli mallista johtuva: osalla muuntogeenisistä eläimistä havaittiin odotusten mukaisesti halvaantumisoireita. Eläimistä 29 kpl lopetettiin lopetuskriteerien perusteella ja 5 hiirtä kuoli MRI-mittauksissa.	Aikaisemmat lopetuspisteet, eläimen ruokinta häkin pohjalta, pidennetyt nipat vesipulloissa.
Gaucherin tauti	Hiiri	Tutkimuksia ei tehty	-	-	-	-
Hunterin tauti.	Hiiri	Tutkimusmalli toimi hyvin ja antoi luotettavia tuloksia (+). Lääkeainetutkimukset onnistuivat suunnitelmien mukaisesti (+).	2700 (*sisältyy pääluvan alle) / 23 hiirtä	Lievä 23 kpl	Lievä (lääkintä, verinäytteet ja käyttäytymistestit). Tutkittavassa kannassa ei havaittu hyvinvointiongelmia.	-
Niemann-Pickin oireyhtymä	Hiiri	Tutkimuksia ei tehty	-	-	-	-

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	-	-	-
Pehmennetty ruoka häkin pohjalla	X	X	X	X
Pitkät nipat vesipulloissa	X	X	X	X

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Veri- ja imusuonten rooli metastasoivissa tuumoreissa ja MS-taudissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Syöpä, EAE-malli, hematopoieesi, verisuonisto, imusuonisto	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Tutkimuksessa selvitetään veri- ja imusuonten merkitystä syö- vissä, autoimmuunisairauksissa ja luuytimen uudelleen muo- dostumisessa. Kaksi kolmannesta syövän etäpesäkkeistä leviää imusuonten kautta. Tämän takia on oleellista ymmärtää etä- pesäkkeiden syntyä paremmin. Imusuoniston on havaittu vii- meaikaisissa tutkimuksissa ulottuvan aivokalvoille saakka. Näi- den suonien merkitys MS-taudin kehittymisessä on mielenkiin- toinen aihepiiri, huomioonottaen imusuoniston elintärkeän roolin immuunisolujen kuljettajana. Veri- ja imusuoniston määrä kasvaa myös tulehduksen aikana. Hankkeessa selvite- tään veri- ja imusuoniston roolia näissä erilaisissa patologisissa tilanteissa.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	<p>Syövän ja MS-taudin laajempi ymmärtäminen lisää kliinisesti re- levantteja hoitomahdollisuuksia potilaiden hoidossa.</p>	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 2700 eläintä	
Ennakoidut haitat eläimille, arvi- oidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	<p>Hiirille aiheutuu kasvainkokeessa haittaa kasvaimen istutuk- sesta ja tutkittavien aineiden annosta. Kokonaisuutena primaarituumorin kantaminen ja niiden kirurginen poisto aiheuttavat hiirissä kohtalaista haittaa. EAE-mallissa hiiret menettävät osit- tain liikuntakykynsä takaraajojen osalta. Tämä aiheuttaa hiirille vakavaa haittaa.</p> <p>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</p>	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	<p>Patologisissa tutkimusmalleissa on tärkeätä saavuttaa mahdolli- simman hyvin ihmisen tautia vastaavat olosuhteet eläintä käyt- tämällä. Solumalleilla ei pystytä samalla tavalla jäljentämään esimerkiksi syövän etenemistä tai sydämen toimintaa, vaan koe-eläinten käyttö on ainoa tapa.</p>	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläi- miä käytetään mahdollisimman vähän?	<p>Koe-asetelmat suunnitellaan huolellisesti, yhteen osakokeeseen käytetään 3-10 hiirtä ja koe toistetaan maksimissaan kolme ker- taa. Hankkeen puitteissa tehdään jatkuvaa suunnittelua, jotta eläinmäärää pystytään muokkaamaan hankkeen edetessä</p>	

	pienemmäksi. Aiempien kokeiden perusteella pystytään arvioimaan pienin mahdollinen eläinmäärä luotettavien tulosten saamiseksi.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a - Hiirellä on nopea lisääntymissykli ja sen genomisekvenssi tunnetaan hyvin. Hiiren biologiassa on yhtymäkohtia ihmisen biologiaan, mikä mahdollistaa ihmistä hyödyttävien hoidollisten sovellusten kehittämisen. Rotta on joissakin sydäntutkimuksissa hiirtä parempi isomman ja ihmisen sydäntä paremmin mallintavan sydämen ja verisuonituksen vuoksi. b - Geenimuunnelluilla kannoilla voidaan selvittää mm. imusuonten toimintavajauksen vaikutusta kasvainten kehittymiseen ja aineenvaihduntaan. c - Kirurgiset toimenpiteet tehdään nukutuksessa ja kivunpoistosta huolehditaan asianmukaisesti. Kasvainkokeissa kasvaimen koon ei anneta kasvaa määrättyä kokoa suuremmaksi ja kasvaimia seurataan kuvantamalla.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 14.4.2020. Arviointi EK 28.5.2020 OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen ensisijainen tavoite oli tutkia eläinmallien avulla syövän etenemistä sekä MS-taudin syntyä. Hankkeen puitteissa tehtiin kuitenkin ainoastaan kokeista MS-taudin tutkimukseen käytettävän EAE-mallin avulla, eikä Osahanke 1 (Tuumorikokeet) käytetty yhtäkään eläintä.

Kokonaisuutena hankkeen tavoitteet onnistuivat erinomaisesti. Tutkimuksessa on tähän asti hankeluvan ajallisissa puitteissa pystytty selvittämään kuinka veri- ja imusuonten pinnassa olevien ilmenevien kasvutekijäreseptorien toiminta vaikuttaa MS-taudin kehittymiseen ja etenemiseen. Tähänastiset tutkimukset ovat julkaistu korkealaatuisessa tiedelehdessä, jossa tämä prosessi kuvataan tarkasti. Käytettävä eläinmalli (hiiri) on ehdottomasti paras malli sairauden tutkimiseen.

2. Millaista haittaa?

Miten toimenpiteet onnistuivat eläinten hyvinvoinnin kannalta / millaisia haittoja eläimille aiheutui?

Kokonaisuutena yksittäiset kokeet etenivät kuten aikaisempi kokemus ja kirjallisuus antoi odottaa. Haitta aiheutui ennen kaikkea hiirten käsittelystä taudin aikaansaamiseksi.

Oliko tosiasiallinen haitta sellainen kuin etukäteen oletettiin?

Haitta oli ajallisesti ja taudinkuvallisesti kuten osattiin odottaa.

Tuliko yllätyksiä? Kuinka paljon eläimiä jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien perusteella?

Hiiret kokivat vakavaa haittaa käsittelyn seurauksena ja kokonaisuutena luvalla olleista hiiristä 72 %, kokivat SV4 tason haittaa.

Kokonaisuutena luvalla olleista eläimistä 42 (3%) löytyi kuolleena kokeen aikana ja 41 (3%) jouduttiin lopettamaan kesken kokeen lopetuskriteerien täytyessä.

NB	18kpl	1%
SV1	110kpl	8%
SV2	78kpl	6%
SV3	187kpl	13%
SV4	997kpl	72%, joista 42 kpl löytyi kuolleen ja 41 lopetettiin kokeen aikana.

3. 3R-mahdollisuudet

Onko käytettävänä uusia vaihtoehtoisia menetelmiä eläinten käytön tilalle?

MS-taudin tutkimisessa edelleen tärkeimpänä ovat hermoverkon omaavat nisäkkäät, jos tuloksilla etsitään konkreettisia hoitokeinoja kliinisiin oireisiin.

Voisiko toimenpiteiden toteuttamistapaa ja/tai hoitomenetelmiä edelleen kehittää?

Kaksi tärkeää uutta parannusta kokeiden aikana olivat lämpimän NaCl lisääminen heikkokuntoisille hiirille sekä jauhe/geeliruuan lisääminen hiirille. Todennäköisesti näistä syistä kokeessa menehtyneiden ja lopettujen hiirten määrä jäi yhteensä 6 %, joka on matalampi mitä kirjallisuus antaa ymmärtää (k.a noin 10 %)

Voisiko inhimillisiä lopetuspisteitä aikaistaa?

Inhimillisen lopetuspisteen aikaistus ei välttämättä enää palvele kliinistä tavoitetta, jossa kudostulehdus on suurta MS-tautia sairastavilla potilailla.

Pitäisikö eläinmääriä muuttaa?

Kokeessa käytetyt eläinmäärät ovat ajateltu sellaisiksi, että ne riittävät antamaan tilastollisesti varmoja tuloksia, ilman että ylimääräisiä hiiriä käytetään.

Voisiko käytetyistä eläimistä saada enemmän tietoa hyödynnettäväksi?

Kokeen jälkeen hiiristä kerätyistä näytteistä analysoidaan monella eri tavalla tulehduksen etenemistä ja kudostuhoa. Näistä mainittakoon mm. solutyypit sekvenoinnit, immunohistokemialliset värjäykset, proteiini analyysit sekä verenkuvasta saatava informaatio.

Olisiko keksityillä 3R-keinoilla laajempaa hyödynnettävyyttä?

Kokeissa käytettiin kaikkia mahdollisia keinoja eläinten hyvinvoinnin parantamiseksi. Tästä esimerkkeinä pidennetyt juomapullon kärjet, pehmyt ruoka, ihonalaiset NaCl annostelut, hiirten genitaalialueiden puhdistaminen sekä ulosteiden poistaminen. Hiiriä seurattiin päivittäin ja lopetuskriteerit noudatettiin koko hankkeen ajan.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
OSA-HANKE1: Tuumorikokeet	Hiiri	-	1500/0	Kohtalainen/Ei käyttöä	Ei haittaa	Ei kommenttia
OSA-HANKE2: EAE-mallit	Hiiri	+++	1420/1391	Vakava/NB (18);SV1 (110); SV2 (78); SV3 (187); SV4 (997)	Mallista aiheutuva haitta, joka 6% tapauksissa aiheutti i) hiirten kuoleman (42 kpl/3%) ii) inhimillisen lopetuspisteen mukainen lopetus (41kpl/3%)	Kokeissa käytettiin kaikkia mahdollisia keinoja eläinten hyvinvoinnin parantamiseksi. Tästä esimerkkeinä pidennetyt juomapullon kärjet, pehmyt ruoka, ihonalaiset NaCl annostelut, hiirten genitaali alueiden puhdistaminen sekä ulosteiden poistaminen. Hiiriä seurattiin päivittäin ja lopetuskriteerejä noudatettiin koko hankkeen ajan.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää.

ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Pidennetyt juomapullon kärjet	X	X	X	X
Pehmyt ruoka	X	X	X	X
Ihonalaiset lämpimät NaCl annostelut	X	X	X	X
Hiirten puhdistaminen	X	X	X	X

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Silmäsairaututkimus kokeellisilla silmätautimalleilla	
Hankeluvan kesto	Kolme vuotta	
Avainsanat	Näkövamma, sokeus, silmävaurio, silmä lääke	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-opetus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Silmäsairaudet tuhoavat hitaasti ja lähes oireettomasti silmän verkkokalvoa ja näköhermoa. Sairauksien etenemistä voidaan hidastaa, mutta usein näkökyky on jo vaurioitunut ennen potilaan hakeutumista hoitoon. Valitettavasti myöhäisessä sairauden toteamisvaiheessa parantavaa hoitoa on erittäin harvoin tarjolla.</p> <p>Suomessa on arviolta 80 000 näkövammaista ihmistä. Maailman terveysjärjestö WHO arvioi, että koko maailmassa on noin 180 miljoonaa näkövammaista. Heistä 40-45 miljoonaa on sokeita ja loput eri tavoin heikkonäköisiä. Eläinluvan hakija tekee lääkeainetestauksia ja tutkii sairauksien synty- ja etenemismekanismeja tutkimuspalveluna yksityisille tutkimus- ja lääkefirmoille.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Silmäsairauksia mallittavien menetelmien käyttö edistää hoitokeinojen löytymistä silmänsairauksiin ja täten estää sokeutumista.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Rotta 1500 kpl, hiiri 2000 kpl, kaniini 800 kpl, marsu 500 kpl	
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	<p>Toimenpiteissä eläimille aiheutuu haittaa silmänsairauden kirurgisesta tai kemiallisesta indusoinnista, MS-taudin indusoinnista, tutkittavien aineiden annosteluista, mitta-antureiden asennuksista ja nukutuksessa tapahtuvista rekisteröinneistä. Eläimet lopetetaan tutkimuksen päätyttyä.</p> <p>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</p>	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Korvaavia soluilla tehtäviä silmänsairausmalleja ei ole saatavilla. Tutkittavat lääkeaineet testataan ensin solukokeilla aina, kun käytettävissä on testaukseen soveltuva solulinja tai tietoa ei ole ennestään riittävästi saatavilla käytettävistä aineista.	
2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koe-eläintyöt suunnitellaan siten, että tarvetta koesarjojen toistamiselle ei olisi. Lisäksi joissain tutkimuksissa käytetään koe-eläimen toista silmää kontrollina, joka vähentää tilastollisesti analysoitaessa käytettävien koe-eläinten määrää.	

3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Kokeissa pitää käyttää eläimiä, joiden silmän rakenne ja toiminta vastaavat mahdollisimman hyvin ihmisen silmää. Pienistä nisäkkäistä hiiren, rotan, kanin ja marsun silmät soveltuvat parhaiten silmätutkimukseen. b) Kyseiset kokeelliset mallit tutkitusti mallittavat hyvin ihmisissä esiintyviä vakavia silmäsairauksia. c) Kipua aiheuttavat toimenpiteet tehdään eläimen ollessa nukutuksessa. Kivunlievityksestä huolehditaan sekä toimenpiteen aikana että sen jälkeen. Eläinten vointia kontrolloidaan säännöllisesti ja inhimillisiä päätepiteitä noudatetaan.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 15.6.2020 Arviointi E.Kaliste 30.6.2020 OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeessa on neljä osahanketta: 1. Verkkokalvon iskemia (rotta), 2. Enkefalomyeliitin tutkiminen (MS-tauti, hiiri), 3. Kokeellinen malli LPS:n aiheuttamasta näköhermon tulehduksesta (rotta), 4. Toksisuusmallit (hiiri, rotta, kani, marsu).

Hankkeen tavoitteena on tehdä palvelututkimuksia, joissa tutkitaan erilaisten silmäsairauksien synty- ja etenemismekanismeja sekä etsitään tai kehitetään niihin hoitomuotoja. Lisäksi eläinmalleja ja tutkimusmenetelmiä on kehitetty eteenpäin. Palvelututkimukset ovat onnistuneet yleensä odotusten mukaisesti. Hankkeen luonteeseen kuuluu, että tutkimustulokset luovutetaan asiakkaalle/palvelun ostajalle, joka jatkaa kehitystyötä eteenpäin.

Käytetyt eläinmallit ovat sopivia hankkeen tarkoituksiin.

Luvan voimassaoloaikana ei tehty yhtään Osahanke 1 (Iskemia) mukaista projektia.

Luvan voimassaoloaikana tehtiin 10 kpl Osahanke 2 (EAE) mukaista projektia, yksi Osahanke 3 (LPS) mukainen projekti sekä 7 kpl Osahanke 4 (Tox) mukaista projektia.

2. Millaista haittaa?

Summa / Number				
Species	Model	Severity	Reason	Summa
Mouse	EAE	Sv1	Not recovering from anesthesia Practice and tissue collection	5
				15
		Sv1		
		Summa		20
		Sv2	Euthanasia [End of study]	131
Sv2				
Summa		131		

		Sv3	Euthanasia [End of study]	147
		Sv3 Summa		147
		Sv4	Bad IVT injection euthanized	1
			Died or found dead	23
			Died under anesthesia or found dead	7
			Euthanasia [End of study]	100
			Found dead	3
			HEP reached	132
			Not recovering from anesthesia	1
		Sv4 Summa		267
		Sv3	HEP reached	15
		Sv3 Summa		15
		EAE Summa		580
	Toxicity	Sv2	Euthanasia [End of study]	30
			Training	2
		Sv2 Summa		32
		Toxicity Summa		32
Mouse Summa				612
Rabbit	Toxicity	Sv2	Euthanasia [End of study]	44
			Sv2 Summa	
		Sv3	Euthanasia [End of study]	9
			Sv3 Summa	
		Toxicity Summa		53
Rabbit Summa				53
Rat	LPS	Sv1	Not recovering from anesthesia	2
			Sv1 Summa	
		Sv3	Euthanasia [End of study]	16
			Sv3 Summa	
		Sv4	Found dead	1
			Sv4 Summa	
	LPS Summa		19	
	Toxicity	Sv1	Euthanasia [End of study]	3
			Sv1 Summa	
		Sv2	Bad IVT injection euthanized	2
			Euthanasia [End of study]	46
		Not recovering from anesthesia	2	
Sv2 Summa		50		

	Sv3	Euthanasia [End of study]	12
		Not recovering from anesthesia	5
	Sv3		
	Summa		17
	Sv3	Bad IVT injection euthanized	1
	Sv3	Summa	1
	Toxicity Summa		71
Rat Summa			90
Kaikki yhteensä			755

Tosiasiallinen haitta oli EAE-mallissa taudin eteneminen ja eläinten halvaantuminen eriasteisesti. EAE-mallissa käytettiin 580 hiirtä, joista 267 (46%) koki vakavaa (Sv4) haittaa. 147 hiirtä (19%) saavutti HEP rajan ja lopetettiin ennen kokeen päättymistä. 36 hiirtä (6%) ei herännyt anestesiasta tai ne löydettiin kuolleena, yleensä seuraavana päivänä. Tämä pääsääntöisesti tapahtui hankkeen alkuaikoina, jonka jälkeen tukihoidoja parannettiin (lämpö, nesteytys) ja kuolemia tapahtui huomattavasti harvemmin. Tosiasiallinen haitta oli odotusten mukaista. Yllätyksenä tuli kuolleisuus nukutuksessa, mutta se saatiin vähenemään tukihoidoilla.

Toksisuustutkimusta tehtiin 32 hiirellä, 53 kanilla (yhteistyössä Turun yliopiston kanssa) ja 71 rottalla. Tosiasiallinen haitta oli tulehdukset tai ärsytykset silmissä, vakavuusluokaltaan lieviä (81%) tai kohtalaisia. Eläimiä voitiin hoitaa antibioottitipoilla ja kipulääkityksellä alentaen haitta kohtalaisesta lievään. Vakavan luokan haittaa ei tapahtunut toksisuustutkimuksissa, mutta 7 rottaa ei herännyt nukutuksesta. Tukihoidoihin kiinnitettiin erityistä huomiota tämän jälkeen. Yhtään eläintä ei jouduttu lopettamaan HEPien perusteella.

LPS-mallissa käytettiin 19 rottaa. Eläimen kokema tosiasiallinen haitta oli kirurgisesti tehty näköhermon paljastaminen. Operaation yhteydessä ja 2 vrk sen jälkeen käytettiin kipulääkitystä, mutta haitan arvioitiin olevan kohtalainen (84%). LPS injektio ei todettu aiheuttaneen eläimille hyvinvointihaittaa kahden viikon kokeessa. Yksi eläin koki vakavan luokan haittaa LPS-mallissa, koska se löytyi operaation jälkeen kuolleena. Yhtään eläintä ei lopetettu HEPien perusteella.

3. 3R-mahdollisuudet

EAE-mallissa kokeen kesto on lyhennetty aikaisemmasta 35 päivästä 28 päivään ja käytössä on aikaisemmat lopetuskriteerit kuin Hooke Laboratories käyttämässä mallissa <https://hooke-labs.com/services/cro/eae/MouseEAEScoring.html>. Ruumiinlämpötilaa pyrittiin mittaamaan infrapunamittarilla hiiren poskesta, mutta siinä todettiin olevan liian suurta vaihtelua todellisen arvon toteamiseksi (jopa alle 20oC hyväkuntoisella hiirellä). Mittausta peräsuolesta ei haluttu ottaa käyttöön, koska EAE-mallissa eläimet ovat hyvin herkkiä stressille, mikä muuttaa taudin ilmenemistä. Lämpötilan mittaamista silmästä ei voida käyttää sen vuoksi, että silmät juuri ovat tutkimuksen kohteena ja laser- tai infrapunasäde voi mahdollisesti vahingoittaa silmää.

Käytössä on ollut häkin pohjalla kuivikkeen alla liuquestematosta leikatut palat. Ne ovat toimineet hyvin edistään eläinten liikkumista, mutta pelkomme on, että eläimet syövät niitä, millä voi olla vaikutus tutkimustuloksiin. Olemmekin valmistuttaneet metallisen reikälevyn, jota pilotoidaan seuraavassa kokeessa. Tukihoidoiksi olemme ottaneet käyttöön kaupallisen tukiruuan häkin pohjalle heti kokeen alusta, jotta eläimet tottuvat siihen. Tämän lisäksi, kun eläimen paino alkaa laskea tai se saavuttaa tietyn kliinisen oireen tason, eläin nostetaan 1-2 tunniksi lämpöalustan päälle, jossa on tarjolla kostutettua rehua ja tukiruokaa. Lämpö edistää ruumiinlämmön ylläpitämistä ja

edistää näin myös syömistä. Rehua kannattaa kostuttaa kunnolla, mielellään yön yli jääkaapissa, jotta se on varmasti pehmeää ja kosteaa. Tämän havaittiin vaikuttavan eläinten halukkuuteen syödä. Nämä toimet ovat erityisen hyvin saanut eläimet toipumaan ja niiden paino voi tuossa kahdessa tunnissa nousta jopa 1-3 g, jolloin niitä ei ole tarvinnut lopettaa lopetuskriteerien täyttymisen vuoksi. Hankkeen alkuaikoina eläimistä jopa 31-75% jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien täytyttyä, mutta loppuvaiheessa yleensä enää 2.5-7% eläimistä jouduttiin lopettamaan lopetuskriteerien täytyttyä. Tässä täytyy kuitenkin ottaa huomioon myös tutkittavat lääkeaineet, joilla on voinut olla erilainen vaikutus taudin etenemiseen ja lopetuskriteerien täyttymiseen. Näitä menetelmiä voidaan käyttää myös muissa malleissa eläinten hyvinvoinnin parantamiseksi. Stressiherkkyyden vuoksi on myös suositeltavaa, että samat muutamat henkilöt käsittelevät ja tekevät eläimille toimenpiteitä, eikä henkilövaihdokset aiheuta lisästressiä.

Aggressiivisilla hiirillä voidaan tappeluita hieman vähentää tekemällä kahdesta iglusta pallo. Tähän ei tosin vielä olla saatu tilastollista merkitsevyyttä. Käytössämme on myös hiirillä kuppimenetelmä nostettaessa sekä rottia nostetaan koko kehosta. Näiden on huomattu vaikuttavan eläimiin rahoitavasti. Olemme myös aloittaneet hankkeen, jossa pyrimme kouluttamaan eläimiä toimenpiteisiin herkkujen ja naksuttimen avulla. Tämä on kuitenkin vielä vaiheessa.

Eläinmalleille ei ole korvaavia menetelmiä. Eläinmäärä kokeessa pidetään minimissä perustuen aikaisempiin kokeisiin, joissa on saatu riittävä ja tilastollisesti merkitsevä tulos. Näissä eläinmalleissa eläinmäärä voidaan pitää pienehkönä myös sen vuoksi, että usein toinen silmä voi toimia verrokina, jolloin sitä varten ei tarvitse erikseen kontrolloida eläimiä.

Käytössä olevia 3R-keinoja voidaan hyödyntää yleisesti myös muissa eläinmalleissa.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
Osahanke 1./Iskemias	Rotta	-	1500 koko luvulle / 0	Vakava / ei haittaa	Ei toteutettu tätä mallia kertaakaan	-
Osahanke 2./EAE	Hiiri	+	2000 koko luvulle / 580	Vakava / 46% vakava, 28% kohtalainen, 23% lievä ja 3% ei toipumista	Mallista aiheutuva halvaantumisen. Joitakin yllättäviä kuolemia joko anestesiasta tai tutkimusaineesta johtuen.	Hyvät tukihoidot (lämpö, tukiruoka, nesteytys, riittävä/matto häkin pohjalla) ja ulkoisten stressitekijöiden vähentäminen
Osahanke 3./LPS	Rotta	+	1500 koko luvulle / 19	Kohtalainen / ei toipumista 11%, 84% kohtalainen, 5% vakava	Eläin löydetty kuolleena. Satunnainen löydös.	Kipulääkitys käytössä toimenpiteen aikana ja 2 vrk sen jälkeen. Nukutuksissa pitää olla hyvä tukihoido
Osahanke 4./Toksisuus	Hiiri	+	2000 koko luvulle / 32	Kohtalainen / 100% Lievä	Lievä haitta injektioista ja nukutuksesta.	Nukutuksissa hyvä tukihoido.
Osahanke 4./Toksisuus	Rotta	+	1500 koko luvulle / 71	Kohtalainen / 5% ei toipumista, 70% lievä, 25% kohtalainen	Ei toipuminen anestesiasta tai epäonnistunut IVT (lasiaisinjektio) injektio. Satunnaista.	Nukutuksissa hyvä tukihoido.
Osahanke 4./Toksisuus	Kani	+	800 koko luvulle / 53	Kohtalainen / 83% lievä, 17% kohtalainen	Silmän tulehtuminen tai ärsytys mallista aiheutuva.	Kipulääkitys ja antibioottitipat silmään.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	X	-	X
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	X
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	X	-
Tukiruoka	X	X	X	X
Nesteytys	X	X	X	X

EAE-mallissa on käytössä aikaisempi päätepiste sekä lyhyempi seuranta-aika. Kaikilla eläimillä on pesämateriaalia häkeissä. Iglusta voidaan tehdä pallo aggressiivisen käyttäytymisen ehkäisemiseksi. Operaatioiden yhteydessä sekä EAE-mallissa käytetään lisälämpöä, tukiruokaa, nesteytystä sekä kostutettua rehua toipumisen edistämiseksi.

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Aivojen rakenteelliset ja toiminnalliset muutokset epilepsiassa.	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	epilepsia; aivovamma; infektio; hiiri; rotta	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Maailmassa on 60 miljoonaa ja Suomessa 47 000 epilepsiapoti- lasta. Noin 60% heistä epilepsia aiheutuu aivoja vaurioittavan tekijän kuten aivovamman tai status epileptituksen seurauk- sena.</p> <p>Epilepsia kehittyy kolmessa vaiheessa: aivoja vaurioittava ta- pahtuma → epilepsian kehittyminen eli epileptogeneesi → tois- tuvat kohtaukset eli epilepsia ja niiden progressio.</p> <p>Käytössä ei ole ainoatakaan lääkettä tai muuta hoitoa, jolla epi- leptogeneesi tai epilepsian progressio voitaisiin estää tai edes lievittää.</p> <p>Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää (a) epileptogeneesin molekulaarisia mekanismeja, (b) epileptogeneesin solu- ja hermoverkkotason mekanismeja, (c) identifioida pahentavatko perifeerinen infektio, stressi, toistuva lievä aivovamma, tai aivovammasta aiheutuva pitkittynyt epi- lepsiakohtaus ennustetta ja millä mekanismilla, (d) identifioida epileptogeneesin biomarkkereita, (e) tutkia, kuinka samankaltaisia epileptogeneesin mekanismit ovat eri etiologioiden pohjalta syntyvissä epilepsioissa [status epileptikus (SE), aivovamma].</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisi- vat hyötyä hankkeen tuloksista)	<p>Tällä hetkellä meillä ei ole ainoatakaan hoitomuotoa, jolla epi- lepsian synty voitaisiin estää riskiryhmän potilailla (esim. aivo- vamma) ja/tai sen eteneminen pysäyttää.</p> <p>Tutkimuksemme identifioi mekanismeja, joiden pohjalta kehi- tämme (a) uusia hoitoja, jotka estävät epilepsian synnyn riskiryhmissä ja epilepsian etenemisen diagnoosin jälkeen sekä (b) biomarkkereita, joilla voimme ennustaa epilepsian kehitty- misen esim. aivovamma jälkeen ja ennustaa/seurata kehittä- miemme hoitojen tehoa.</p>	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 900, rotta 2 100	

<p>Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</p>	<p>Eläimille aiheutuu tutkimuksessa haittaa kirurgiasta, epilepsian indusoinnista ja epilepsian kehittymisestä, annosteluista, kuvantamisista, nukutuksista ja stressimalleista. Eläimet lopetetaan toimenpiteen päätyttyä.</p> <p>Vakavuusluokat: kohtalainen, vakava</p>
<p>3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</p>	
<p>1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</p>	<p>Olemme käyttäneet primaarisoluviljelmiä sekä leikeviljelmiä, mutta niiden ennustearvo esim. lääkeaineiden hermosoluja suojaavan vaikutuksen suhteen <i>in vivo</i> on huono. Epilepsian kehittymistä hermosolutasolla ei voida tutkia ihmisellä, koska hyvää aivokudosta ei ole saatavissa tutkimukseen (esim. aivovamman jälkeen kehittyvää epilepsiaa voidaan seurata vain kliinisin kriteerein).</p> <p>Rotta ja hiiri ovat sopivia koe-eläimiä epilepsiatutkimukseen aikaisempien havaintojen pohjalta, jotka osoittavat tautifenotyypin (esim. epilepsia, käyttäytymismuutokset), patologian ja lääkeaineiden tehon verrannollisuuden/samankaltaisuuden rotalla/hiirellä ja ihmisellä.</p> <p>Geenipoikkeavuuksien vaikutusta solukuolemaan ja toipumisprosessiin on käytännöllisintä tutkia hiirillä, koska ko. tekniikat ovat parhaiten sovellettavissa eri hiirilajien tuotantoon.</p>
<p>2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</p>	<p>Pyrimme tutkimaan jokaisen koe-eläimen mahdollisimman tarkkaan (patologia, molekulaarinen analyysi, sähköfysiologia, käyttäytyminen, kuvantaminen) aiheuttamatta yksittäiselle eläimelle liikaa stressiä, mikä merkittävästi vähentää tarvittavien koe-eläinten määrää. Tarvittava koe-eläinmäärä arvioidaan etukäteen Power-analyysillä.</p>
<p>3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</p>	<p>a-b) Rotta ja hiiri ovat sopivia koe-eläimiä epilepsiatutkimukseen aikaisempien havaintojen pohjalta, jotka osoittavat tautifenotyypin, patologian ja lääkeaineiden tehon verrannollisuuden/samankaltaisuuden rotalla/hiirellä ja ihmisellä.</p> <p>c) Lisäksi pyrimme tutkimaan jokaisen koe-eläimen mahdollisimman tarkkaan (patologia, molekulaarinen analyysi, sähköfysiologia, käyttäytyminen, kuvantaminen) aiheuttamatta yksittäiselle eläimelle liikaa stressiä, mikä merkittävästi vähentää tarvittavien koe-eläinten määrää. Tutkimuksessa noudatetaan ennalta määrättyjä lopetuskriteerejä.</p>
<p>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</p>	<p>KYLLÄ</p>

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 27.1.2021. Arviointi EK 29.1.2021: OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Mitä tavoitteita hankkeella oli?

Tavoite: Aivovamman jälkeisen epilepsian syntymekanismien, biomarkkerien ja hoitojen löytäminen.

Miten näiden saavuttamisessa onnistuttiin?

Projektit ovat edelleen menossa ja tutkimuksen tulokset ovat parhaillaan analysoitavana.

Onko käytetty eläinmalli sopiva tähän tutkimukseen?

Tutkimuksessa käytettävä nestepulssimalli on yksi parhaista ja eniten käytetyistä ihmisen aivovamman ja sen aiheuttaman epilepsian koe-eläinmalleista.

2. Millaista haittaa

Vakavin haitta on duran ehjänä säilyttävä kraniotomia ja sen kautta aiheutettu aivovamma. Vakavuusluokka on SV4. Akuutti kuolleisuus vakavaa aivovammaa mallintavaan iskuun on n. 25% ja keskivaikeaa tai lievää aivovammaa mallintavaan iskuun 0%.

Aivovamman jälkeen havaitaan painonlasku ja sitä seuraava painonnousu, mikä alkaa tyypillisesti 5-7 päivää aivovammasta. Eläimet lopetetaan ja poistetaan tutkimuksesta, jos painonlasku on yli 30% ja toipuminen ei ala ensimmäisellä viikolla. Yli 30%:n painonlaskua havaitaan 2%:lla eläimistä.

Aivovamman aiheuttamisen jälkeen eläinten painoa tarkkaillaan päivittäin, niille annetaan lisäravintoa, pehmeää ruokaa ja fysiologista suolaliuosta yleensä ainakin ensimmäisen viikon ajan tai niin pitkään, kunnes eläin pystyy syömään ja juomaan itse.

Eläinten muuta hyvinvointia seurataan tarkastelemalla ruumiinlämpöä, yleisilmettä (ääntely, nilkutus, aggressiivisuus, kyyryasento), ulostamista, liikkeitä, ulkoisia vuotoja yms.

3. 3R-mahdollisuudet

Onko käytettävänä uusia vaihtoehtoisia menetelmiä eläinten käytön tilalle?

Aivovamman jälkeistä epilepsiaa ei pystytä mallintamaan muuten kuin eläinmalleilla.

Voisiko toimenpiteiden toteuttamistapaa ja/tai hoitomenetelmiä edelleen kehittää?

Kyllä, työskentelemme tämän parissa jatkuvasti.

Voisiko inhimillisiä lopetuspisteitä aikaistaa?

Ei tässä mallissa, koska epilepsian kehittyminen aivovamman jälkeen kestää useita kuukausia.

Pitäisikö eläinmääriä muuttaa?

Kussakin koesarjassa tarvittava eläinmäärä perustuu voimalaskelmiin, joiden tekemiseen meillä on runsaasti aikaisempaa tietoa. Siksi käyttämämme eläinmäärät ovat jo nyt minimissään.

Voisiko käytetyistä eläimistä saada enemmän tietoa hyödynnettäväksi?

Jokainen eläin tutkitaan mahdollisimman monipuolisesti (esim. käyttäytyminen, kuvantaminen, aivosähkökäyrä, verinäytteen) huomioiden eläimille mahdollisesti aiheutuva stressi.

Olisiko keksityillä 3R-keinoilla laajempaa hyödynnettävyyttä?

Pohdimme tätä mahdollisuutta koesarjoissamme, erityisesti monikeskustutkimuksissa.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3. **KÄYTETTY LUOKITTELU: SV4=vakava, SV3=kohtalainen, SV2=lievä, SV1=ei heräämistä.**

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu: yhteensä 2100 rottaa ja 900 hiirtä/ tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
1	rotta	+	2100/682	SV4/SV4 69%, SV3 15%, SV2 11%, SV1 4%	-	Tutkimus-suunnitelmien uudelleen arviointi ja tutkimuksen organisointi, tutkimuseläinten kivunlievityksen ja nesteytyksen parantaminen.
1	hiiri	+	900/171	SV4/SV4 12%, SV3 26%, SV2 11%, SV1 56%	-	Tutkimus-suunnitelmien uudelleen arviointi ja tutkimuksen organisointi, tutkimuseläinten kivunlievityksen ja nesteytyksen parantaminen.
2	rotta	+	2100/53	SV4/SV4 79%, SV1 15%, NB 6%	-	Tutkimus-suunnitelmien uudelleen arviointi ja tutkimuksen organisointi, tutkimuseläinten kivunlievityksen ja nesteytyksen parantaminen.
3	rotta	+	2100/303	SV4/SV4 89%, SV3 10.5%, SV2 0.5%	-	Tutkimus-suunnitelmien uudelleen arviointi ja tutkimuksen organisointi, tutkimuseläinten kivunlievityksen ja nesteytyksen parantaminen.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X		-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	X
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	-	-
Ravinto ja vitamiinien saannin lisääminen/vähentäminen	x	x	-	x

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Sydämen solujen toimintaa ja solukuolemaa säätelevät signaalintireitit	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	Sydän, liikakasvu, signalointi, sydämen vajaatoiminta, solukuolema	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Ei
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-opetus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Kyllä
Hankkeen tavoitteet (esim. tieteellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Sydäninfarktin hoito on selvästi nopeutunut viime vuosien aikana, mutta terapioiden teho verenkiertoelinten sairauksille on ollut riittämätön. Sydänlihaksen iskemian seurauksena osa sydänlihaksesta menee kuolioon ja korvautuu ajan myötä sidekudoksella.</p> <p>Terveenä säilyneen sydämen lisääntynyt seinämäkuormitus aiheuttaa sydänlihassolujen liikakasvua ja voi myös johtaa sydämen sidekudoksen (fibroosin) lisääntymiseen ja sydämen vajaatoimintaan. Tällä hetkellä sydämen vajaatoimintaan käytössä olevat terapiat vähentävät sydämen kuormitusta riippumatta taudin syistä.</p> <p>Olisikin tärkeä pystyä identifioimaan sydämen hypertrofian, fibroosin ja vajaatoiminnan syntymisen kannalta keskeiset signaalinsiirtoreitit, jotta niihin voitaisiin kehittää tehokkaampia lääkehoitoja.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi, kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)	Tämän eläinkokeen tarkoitus on selvittää signaalireittejä, joiden säätelyyn vaikuttamalla voitaisiin lievittää sydänkudoksen vauriota sydäninfarktissa sekä estää sydämen fibroosin ja hypertrofian kehittyminen. Hiirille indusoidaan sydämen vasemman kammion toiminnan heikkenemistä ja fibroosia kokeellisen sydäninfarktin, poikittaisen aortan ahauttamisen, angiotensiini II-infuusion, alkoholin tai solukuolemaa aiheuttavien syöpälääkkeiden avulla.	
Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät	Hiiri 5940, rotta 368	
Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä	<p>Sydämen toiminnan ohimenevä tai pysyvä heikkeneminen. Eläimet lopetetaan kokeen päättyessä.</p> <p>Vakavuusluokat: ei haittaa, lievä tai kohtalainen</p>	
3R-menetelmien soveltaminen - Application of the 3Rs		
1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?	Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää patologisen sydämen vajaatoiminnan kehittymiseen vaikuttavia signaalintimekanismeja ja spesifisten signaalintireittien modifikaatioiden vaikutusta niihin. Siksi ongelman tarkasteluun tarvitaan kokonainen, toimiva elimistö. Soluviljelymalleja käytetään täydentävänä menetelmänä soveltuvin osin. Ne kuvastavat kuitenkin tilannetta vain eristetyssä solussa tai sydämessä, eikä vaikutuksia koko verenkiertoelimistön kannalta voida selvittää.	

2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?	Koesarjoihin valitaan optimaalinen määrä eläimiä tutkimuksen luotavuuden takaamiseksi. Kokeeseen käytettävien eläinten lukumäärä rajataan mahdollisimman pieneksi.
3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?	a) Hiiri- ja rottamalleilla suoritettut tutkimukset ovat vertailukelpoisia erilaisilla poisto- tai siirtogeenisillä eläimillä suoritettujen tutkimusten kanssa. b) Hiiri on kokonsa ja elinikänsä puolesta paras vaihtoehto tämän tyyppiin perustutkimuksen kokeisiin. Rotan etuna hiireen verrattuna on tarkempi sydämen toiminnan ja rakenteen analyysi sydämen kaikukuvantamisen avulla. c) Nukutus- ja kivunpoistomenetelmät on suunniteltu mahdollisimman hyvin toimenpide huomioon ottaen. Eläinten hyvinvointia seurataan tiheästi paitsi koe-eläinhoitajien, myös tutkijoiden toimesta. Yleensä jo ensimmäisen toimenpiteen jälkeisen vuorokauden aikana näkee, miten eläin toipuu toimenpiteestä. Tutkimusryhmällämme on runsaasti kokemusta näistä toimenpiteistä rotilla ja hiirillä.
Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi	KYLLÄ

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 6.2.2021. Tark EK 16.2.2021 OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Tämän eläinkokeen tavoitteena oli selvittää signaalireittejä, joiden säätelyyn vaikuttamalla voitaisiin lievittää sydänkudoksen vauriota sydäninfarktissa sekä estää sydämen fibroosin ja hypertrofian kehittyminen infarktinvaurion jälkeen tai sydämen painekuormituksessa. Hiirille indusoitiin sydämen vasemman kammion toiminnan heikkenemistä ja fibroosia kokeellisen sydäninfarktin, poikkittaisen aortan ahtauttamisen, angiotensiini II-infuusion tai solukuolemaa aiheuttavien syöpälääkkeiden avulla. Tutkimme myös miten tietyt sydämen patologisissa mekanismeissa osalliset signaalireitit säätelevät sydämen normaalia kasvua fyysisessä rasituksessa.

Olemme kyseisiä malleja sekä soluviljelymenetelmiä hyödyntäen identifioineet useita signaalinvälitysreittejä, jotka osallistuvat sydänvaurioiden kehittymiseen eri tilanteissa. Olemme myös kokeellisesti targetoineet näitä signaalireittejä sydänkudoksen vaurion vähentämiseksi. Käytetyt eläinmallit ovat kirjallisuuden ja kokemamme perusteella sopivin olemassa olevista malleista tutkimaan kyseisiä sydänmuutoksia. Selvitettäessä patologisen sydämen vajaatoiminnan kehittymiseen vaikuttavia signaalintimekanismeja ja niiden muokkauksen vaikutusta, ongelman tarkasteluun tarvitaan kokonainen, toimiva elimistö. Pelkästään soluviljelymallien avulla ei vaikutuksia koko verenkiertoelimistön kannalta voida selvittää. Hiiri- ja rottamalleilla voimme hyödyntää signaalireittien tutkimisessa poisto- tai siirtogeenisiä eläimiä, ja tulokset ovat vertailukelpoisia muiden geenimuunnelluilla hiiri- tai rottamalleilla tehtyjen tutkimusten kanssa. Käytämme osin perinteisiä menetelmiä vähemmän haitallisia malleja, esimerkiksi kokeellinen sydäninfarkti hiirelle tehdään paljastamalla sydän kylkiluuvälistä eikä perinteisen rintakehän avaamisen avulla, jolloin eläimelle koitua

haitta on vähäisempi. Myös osa painekuormituskokeista voidaan korvata farmakologisin menetelmin.

2. Millaista haittaa?

Sydämen kirurgisista operaatioista (infarktimalli tai aorttaa kaventava painekuormitusmalli) aiheutuu huomattava sydämen toiminnan heikkeneminen ja ääritapauksissa äkkikuolema. Sydämen ultraäänitutkimuksella voidaan havaita selkeä sydämen pumppaustoiminnan heikentyminen. Koe-mallilla operoidut hiiret ovat aina vakavaluokitukseen kuuluvia vaikei ulkoisia haittoja ilmenisi-kään. Operoidut hiiret toipuvat toimenpiteestä nopeasti ja ovat pääsääntöisesti ulkoisesti aktiivisia ja hyvinvoivia. Osalla kuitenkin ilmenee heikkoutta tai toimenpiteestä johtuvaa kuolleisuutta.

Noin neljäsosa infarktioperoiduista hiiristä kuolee joko anestesiassa operaatiosta aiheutuvaan ve-renvuotoon tai hengityskomplikaatioihin, muutaman päivän kuluttua operaatiosta sydämen va-semman kammion repeytymisen tai rytmihäiriön vuoksi äkillisesti, keuhkotoiminnan heikentymi-sestä johtuvaan hengitystoiminnan äkilliseen lamaantumiseen tai myöhemmin sydämen vajaatoi-minnan keuhkokomplikaatioihin. Eri hiirikannoilla ilmenee erilaisia sydäninfarktista johtuvia ongel-mia ja siksi eri hiirikantoja myös käytetään infarktivaaurion mekanismien tutkimiseksi. Osa ongel-mista on äkillisiä ilman ennakkovaroitusta ilmeneviä, mutta osa oireista voidaan tunnistaa ja osa hiiristä joudutaankin lopettamaan ennenaikaisesti. Myös sydämen painekuormitusmalliin liitty-y vastaavanlaista operaation aikaista tai sen jälkeistä kuolleisuutta. Tosiasialliset haitat olivat odote-tunlaisia, mitä on kirjallisuudessa kuvattu ja aiemmin havaittu.

Hankeluvan kokeissa käytettiin yhteensä 470 eläintä, joista 166 vakavaluokituksen alla. Eläimistä 11 jouduttiin lopettamaan ennenaikaisesti lopetuskriteerien takia, mukana luvussa on myös muun kuin koetoimenpiteen takia lopetetut. Operoiduista eläimistä 43 kuoli koetoimenpiteen aikana tai sen seurauksena (anestesiassa kuolleet on voitu luokitella myös alempiin vakavuusluokkiin).

3. 3R-mahdollisuudet

Korvaavat menetelmät. Sydänlihassaurion ja sydämen vajaatoiminnan kehittymiseen sekä sydä-men fysiologiseen kasvuun vaikuttavat solujen fyysinen kuormitus kuten venytys, autonominen hermosto sekä kiertävät humoraaliset tekijät. Ne aiheuttavat muutoksia sydänlihassolujen, sydä-men sidekudossolujen, endoteelisolujen sekä tietyissä tilanteissa tulehdussolujen toimintaan. Jois-sain tilanteissa solumallit soveltuvat yksinkertaisten kysymysten selvittämiseen, mutta tutkittavien ilmiöiden tutkiminen vaatii kokonaisen elimistön.

Ei-kirurgisiin sydäntautimalleihin liittyy pienempi kuolleisuus. Hyödynnämme myös farmakologista painekuormitusmallia, mutta koemallit mallintavat erilaista kudospatologiaa, joten ne eivät ole suoriltaan vaihtoehtoiset menetelmät. Otamme käyttöön myös täydentävän ei-kirurgisen sydän-sairausmallin etenkin sydämen fibroosin tutkimiseen. Oletamme sen aiheuttavan vähemmän tai lievempiä hyvinvointiongelmia. Käytämme myös soluviljelykokeita täydentävinä malleina.

Eläinten määrän vähentäminen. Koesarjoihin valitaan optimaalinen määrä eläimiä tutkimuksen luotettavuuden takaamiseksi. Kokeeseen käytettävien eläinten lukumäärä rajataan mahdollisim-man pieneksi. Vakiintuneissa malleissa voimalaskelmien käyttö tarvittavan eläinmäärän valintaan on mahdollista.

Osa näytteistä saadaan yhteistyöstä toisen laboratorion kanssa, jotka tutkivat muita kudoksia mal-
leissa, jotka aiheuttavat myös mahdollisia sydänmuutoksia. Omissa kokeissa muutosten tutkimi-
nen myös muissa kudoksissa lisää tutkimustulosten hyödynnettävyyttä ja validiutta.

Eläinten totuttaminen käsittelystressin vähentämiseksi todennäköisesti vähentää tarvittavien
eläinten määrää ja parantaa tutkimusten luotettavuutta. Hiiret ovat hyvin rauhallisia ja yhteistyö-
kykyisiä muutaman käsittelykerran ja positiivisen palkitsemisen jälkeen.

Hyvinvoinnin parantaminen. Tutkimme tiettyjä sydänmuutoksia varhaisessa vaiheessa patogenee-
sia, jolloin lopetuspiste on aiemmin.

Hiirten totuttaminen käsittelyyn vähentää niiden kokemaa käsittelystressiä.

Toimenpiteiden jälkeen tehostettu hoito (lämpöhuone, nesteytys tarvittaessa ja normaali kipulää-
kitys) saattaa parantaa selviämistä sekä yleensä parantaa vointia. Kipulääkityksen voi antaa myös
juomavedessä tai pähkinävoissa mikä vähentää käsittelyn ja pistosten tarvetta.

3R-periaatteita voisi ehkä edistää jakamalla tutkijoiden havaitsemat ja kirjaamat käytännöt erilli-
selle listalle tiivistetysti esim. ELLA:n sivuille. Tutkimusten tiivistelmissä oli käyttökelpoista tietoa
mutta harva viitsii lukea pitkiä raportteja ja etsiä 3R-keinoja tekstin keskeltä. Olisi hyvä, että eri yli-
opistojen havaitsemat hyvät käytännöt tulisivat kaikkien tutkijoiden tietoon.

Muuta

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli? Oliko toistuva, mallista aiheutuva vai satunnainen	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa? Miten haittaa pystyttiin/pystyttäisiin jatkossa vähentämään?
OH1	hiiri, rotta	+	1884/ 301	SV4/ SV1 n=15 SV2 n=115 SV3 n=99 SV4 n=72	Koetoimenpiteestä johdettava heikkous ja kuolema tai ennenaikainen lopetus lopetuskriteerien täytyttyä	käsittelystressin vähentäminen eläinten totuttamisella. eläinten tehostettu hoito toimenpiteen jälkeen: lämpöhuone, nesteytys, kipulääkitys pähkinävoissa
OH2	hiiri, rotta	+	2224/ 127	SV4/ SV1 n=22 SV2 n=20 SV3 n=1 SV4 n=84	Infarktista aiheutuva äkki-kuolema tai ennenaikainen lopetus lopetuskriteerien täytyttyä	käsittelystressin vähentäminen eläinten totuttamisella. eläinten tehostettu hoito toimenpiteen jälkeen: lämpöhuone, nesteytys, kipulääkitys, kipulääkitys pähkinävoissa
OH3	hiiri	+	560/ 32	SV3/ SV1 n=3 SV2 n=7 SV3 n=22	Juoksusta aiheutuva fyysinen rasitus terveillä hiirillä	käsittelystressin vähentäminen eläinten totuttamisella. juoksuharjoittelussa hiirimäärät pienet. hiirten palkitseminen.
OH4	hiiri	+	1000/ 10	SV4/ SV4 n=10	kuolema mahaletkutuksen vuoksi. tamoksifeenista tai tutkittavasta aineesta aiheutuva heikkous ja kuolema	käsittelystressin vähentäminen eläinten totuttamisella. pienille vilkkaille hiirille (21-24g) lääkeaineen annostelu i.p. turvallisempi tapa kuin intragastrinen anto. jos tutkittava aine aiheuttaa heikkoutta, aineen annostelun lyhyt tauotus (ellei häiritse koeasetelmaa)
OH5	hiiri	na	640/ 0	SV3/ ei kokeita	-	-

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankkeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Aikaisempi päätepiste	X	X	-	-
Lyhyempi seuranta-aika	X	X	-	-
Pesämateriaali	X	X	X	-
Lisälämpö operoinnin jälkeen	X	X	X	X
Totuttaminen	X	X	X	X

YLEISTAJUINEN TIIVISTELMÄ JULKAISTAVAKSI NETISSÄ		
Hankkeen nimi	Hereillä olevilla rotilla tehtävä toiminnallinen magneettikuvantaminen traumamallissa	
Hankeluvan kesto	3 vuotta	
Avainsanat	magneettikuvaus, EEG, trauma	
Hankkeen tarkoitus	Perustutkimus	Kyllä, Ei
	Translaatio- tai soveltava tutkimus	Kyllä
	Lakisääteinen käyttö ja rutiinituotanto	Ei
	Ympäristönsuojelu ihmisten tai eläinten terveyden tai hyvinvoinnin vuoksi	Ei
	Lajien säilyttäminen	Ei
	Korkeamman asteen koulutus tai ammattitaito-ope- tus	Ei
	Oikeuslääketieteelliset tutkimukset	Ei
	Geneettisesti muunnetun kolonian ylläpito	Ei
Hankkeen tavoitteet (esim. tie- teellinen tieto, jota haetaan taikka tieteelliset tai hoidolliset tarpeet)	<p>Traumaattinen päänvamma aiheuttaa potilaissa usein vakavia kroonisia muutoksia (mm. epilepsia, masennus, kognitiiviset ongelmat), joita ei tällä hetkellä pystytä ennustamaan eikä hoi- tamaan.</p> <p>Hoitojen kehittämisen kannalta on ensiarvoisen tärkeää, että oireistolle löytyy non-invasiivisesti mitattavat biomarkkerit. Ku- vantaminen voi mahdollistaa tulevaisuudessa myös potilaiden yksilöllisen hoidon, mikä on välttämätöntä koska päänvamman jälkeinen taudinkuva vaihtelee erittäin paljon riippuen iskun paikasta, tyypistä ja voimakkuudesta.</p> <p>Toiminnallinen magneettikuvantaminen (fMRI) on monipuoli- nen kuvantamismenetelmä, joka mahdollistaa aivojen toimin- nan tutkimisen kehoon kajoamatta, hyvällä aika- ja paikkatark- kuudella. Eläimillä tehtävissä fMRI-kokeissa nukutusaineet ovat kuitenkin merkittävä haittatekijä, koska ne muokkaavat voimak- kaasti aivojen perustoimintaa, vaikuttaen tutkimustuloksiin.</p> <p>Tästä syystä tässä hankkeessa hyödynnetään uudenlaista me- netelmää, joka mahdollistaa fMRI-kuvantamisen hereillä ole- villa rotilla. Kartoitamme em. menetelmällä aivokuorivaurion aikaansaamia toiminnallisia muutoksia aivoissa, mahdollista epilepsian kehittymistä ja mahdollisia uusia diagnoosi- ja/tai hoitokohteita.</p> <p>Tutkimuksissa käytämme fMRI:n lisäksi elektroenkefalografiaa (EEG) epileptisten kohtausten tunnistamiseksi; EEG tarjoaa erinomaisen aikaresoluution aivojen sähköisen toiminnan tutki- miseen fMRIhin verrattuna. Positroniemissitomografian (PET) avulla pystymme kartoittamaan aivojen tulehdustilan aivokuori- vaurion jälkeen. Lisäksi Neuroscore-motoriikkatestillä tutkimme rottien liikkuvuutta vaurion jälkeen.</p>	
Hankkeesta saatava mahdollinen hyöty (kuinka tiede edistyisi,	Hereillä olevilla ja aivokuorivauriota mallintavilla rotilla tehtävä MRI-tutkimus palvelee epilepsian varhaisvaiheen diagnosointia, ja biomarkkerien löytämistä sekä lisää ymmärrystä aivojen	

<p>kuinka ihmiset tai eläimet voisivat hyötyä hankkeen tuloksista)</p>	<p>toiminnan muutoksista vasteena aivokuorivaurioon. Lisäksi hereillä olevilla eläimillä saadut tulokset ovat paremmin siirrettävissä kliiniseen käyttöön (verraten tutkimuksiin, joissa on käytetty nukutusaineita).</p>
<p>Käytettävät eläinlajit ja eläinmäärät</p>	<p>Rotta, 70 eläintä</p>
<p>Ennakoidut haitat eläimille, arvioidut vakavuusluokat, eläinten kohtalo toimenpiteen päätyttyä</p>	<p>Tutkimuksissa eläimille ennakoitu kokonaishaitta on vakava. Eläimet totutetaan ensin olemaan hereillä MRI-laitteen kopioympäristössä. Hereillä tehtävän kuvantamisen on todettu aiheuttavan stressiä, mutta koulutuksen myötä stressitaso kuitenkin vähenee jo muutamien päivien jälkeen. Eläimet ovat hereillä kopioympäristössä tai MRI-laitteen sisällä kiinnitettyinä pehmustettujen tukien avulla, siten että eläinten vapaa hengitysliike ei esty. MRI-mittauksen aikana eläimet ovat lepotilassa (ei ulkoista ärsykettä).</p> <p>Eläimille aiheutetaan aivokuorivaurio (fluid percussion-model) syvässä nukutuksessa. Vamman jälkeisen seurantajakson aikana osa eläimistä voi saada haitaltaan lieviä tai kohtalaisia epileptisiä kohtauksia. Eläimiä pidetään verkkoväliseinillä varustetuissa parihäkeissä koko tutkimusjakson aikana mikä mahdollistaa eläinten välisen vuorovaikutuksen ja vähentää huomattavasti eläinten kokemaa kokonaisstressiä (vrt. yksittäishäkki).</p> <p>Vakavuusluokat: vakava</p>
<p>3R-menettelmien soveltaminen - Application of the 3Rs</p>	
<p>1. Korvaaminen - Replacement Miksi eläimiä on käytettävä tässä hankkeessa ja miksi korvaavaa menetelmää ei voi käyttää?</p>	<p>Tavoitteena on kehittää MRI menetelmiä koko aivot kattavaan tutkimukseen, jolloin tietokonesimulaatiot, solu- tai leiketutkimukset eivät pysty tarjoamaan vaihtoehtoa.</p>
<p>2. Vähentäminen - Reduction Kuinka on varmistettu, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän?</p>	<p>Arvio tarvittavasta eläinmäärästä perustuu aikaisempaan kokemukseemme hajonnasta vastaavista tutkimuksista sekä niiden avulla laskettuun voima-analyysiin</p>
<p>3. Parantaminen - Refinement a) Perusteet eläinlajin valinnalle. b) Miksi valittu eläinmalli on paras tieteellisten tavoitteiden kannalta? c) Miten eläimille aiheutettu haitta on tarkoitus minimoida?</p>	<p>a/b) MRI-tutkimuksia on tehty useilla eri eläinlajeilla (kädelliset, kissat, rotat, hiiret). Rottia käytämme niiden hyvän saatavuuden sekä hyvin tunnetun fysiologian ja anatomian vuoksi. Rotat ovat helpompi kuvauskohde verrattuna hiiriin suurempien aivojen vuoksi. Rotille olemme myös kehittäneet aiemmin hereillä olevan kuvausmenetelmän.</p> <p>c) Eläinten fysiologisia toimintoja ja liikkeitä seurataan toimenpiteiden ajan, jotta voidaan varmistua stressin tasosta. Leikkauksien aikana eläimet ovat syvässä nukutuksessa, ja eläimille annetaan tarvittavat kipulääkkeet.</p>
<p>Hankkeesta ei tehdä / tehdään takautuva arviointi</p>	<p>KYLLÄ</p>

TIEDOT HANKKEEN TAKAUTUVAA ARVIOINTIA VARTEN

Saapumispvm: 25.11.2020. Arviointi E.Kaliste 17.12.2020: OK.

1. Hankkeen tavoitteiden saavuttaminen

Hankkeen tavoitteena oli kerätä tietoa aivokuorivamman aiheuttamista pitkäaikaisista aivojen verkostointimuutoksista sekä tulehdustilasta, jotka voisivat mahdollisesti selittää mm. epilepsian syntymekanismeja ja toimia ennustavina diagnosointimarkkereina kliinisessä ympäristössä. Näin laajaa verkostotason seurantatutkimusta ei ole aikaisemmin toteutettu eläinkokeissa. Lisäksi tavoitteena oli toteuttaa aivovamman muokkaamien aivoverkoston kartoitus hereillä olevilla rotilla, jolloin tyypillisesti käytettävien nukutusaineiden vakavat haittavaikutukset voidaan minimoida. Hereillä olevien rottien kuvantaminen on yksikkömme erikoisosaamista maailmanlaajuisella tasolla, ja menetelmää hyödyntämällä pystytään saavuttamaan merkittävästi luotettavampaa aivojen verkostotason aineistoa verrattuna nukutettuihin rottiin. Lisäksi yhtenä tavoitteena oli kerätä yksi laajimmista aineistoista toiminnallisen magneettikuvantamisen alalla, etenkin hereillä olevien eläinten kontekstissa.

Hanke aloitettiin suunnitelman mukaisesti täysin hereillä olevilla eläimillä tehdyillä magneettitutkimuksilla. Muutaman kuukauden kuluttua aloituksesta arvioimme jo kerätyn aineiston laatua, ja totesimme mittausten aikaisen liikkeen vaarantavan tulosten tilastollisen luotettavuuden pitkässä seurantatutkimuksessa. Liikettä esiintyi perustason mittauksissa, jo ennen varsinaista aivokuorivauriota. Magneettitutkimuksen aikainen liike tekee aineistosta lähes käyttökelvotonta, joten liikkeen minimointi on teknisistä syistä äärimmäisen tärkeää. Jotta emme vaarantaisi suurta ja työlästä tutkimuskokonaisuutta, päätimme siirtyä kevyesti nukutettuihin eläimiin, ja aloitimme koesarjan alusta. Kevyt nukutus minimoi eläinten liikkeen ja samalla lievittää merkittävästi eläimen kokemaa kokonaishaittaa. Kompromissina, tiettyjen aivoalueiden verkostoitumismuutokset eivät ole välttämättä havaittavissa, mutta kokonaisuuden kannalta tämän katsottiin olevan hyväksyttävä tekijä. Muilta osin hankkeen tutkimukset suoritettiin suunnitellusti ja haluttu aineisto saatiin kerättyä.

Lopullisten johtopäätösten vetäminen on vielä liian aikaista, koska usealla eri menetelmällä kerätyn aineiston yhdistäminen ja analysointi on vielä kesken. Analysointi on alalle tyypillisesti hyvin haastavaa, ja oletamme että lopulliset tulokset saadaan 1-2 vuodessa. Tästä huolimatta alustavat tulokset osoittavat, että lähtötasolla mittausaineiston laatu on osittain jopa odotettua parempaa, ja tähän liittyvä ensimmäinen tieteellinen julkaisu on jo työn alla. Mahdollisuudet havaita aivojen verkostorakenteen muutoksia aivovamman seurauksena ovat siis hyvät. Alustavat analyysimme viittaavat kuitenkin myös siihen, että epileptiset kohtaukset jäivät hankkeessa vähäisiksi. Tämä on erittäin positiivinen tekijä rottien hyvinvoinnin kannalta, mutta negatiivinen tekijä epilepsiatutkimuksen osalta. Asia on kuitenkin varmennettava vielä tarkemmalla aineiston analysoinnilla seuraavien vuosien aikana.

Hereillä olevilla eläimillä tehtävä magneettitutkimus oli yhdistetty ensimmäistä kertaa aivokuorivamman eläinmalliin. Kuten jo yllä todettiin, täysin hereillä olevien eläinten liike mittausten aikana oli arviomme mukaan hieman liian suurta ja saattaisi vaarantaa tutkimustulosten tilastollisen tehon. Tästä syystä teimme menetelmiimme hienosäätöä, joka osoittautui lopussa hyväksi ratkaisuksi. Kysymykseen, oliko aivokuorivammamalli hankkeeseen sopiva, on vielä vaikea antaa vastausta. Aineiston laajuus ja määrä ovat alustavan analyysin perusteella hyvällä tai erittäin hyvällä tasolla, ja aivokuorivaurion aiheuttamat aivomuutokset pystytään hyvin todennäköisesti

havaitsemaan ja julkaisemaan. Toisaalta vähäiset epileptiset kohtaukset vievät epilepsiatutkimusosuudelta tilastollista tehoa, mutta tämä tekijä voi vielä muuttua myöhemmin tarkemmassa analyysissä.

2. Millaista haittaa?

Hankkeessa käytettiin 147 rottaa (luvissa yhteensä sallittu 152). Eläinten kokema haitta oli pääasiassa hankesuunnitelmassa esitettyjen arvioiden mukaista. Hankkeen vakavin toimenpide oli kiistatta aivokuorivaurion aiheuttaminen, josta eläimelle koituu kohtalaista-vakavaa haittaa (pääasiassa heikko yleiskunto, rajoittunut liikkuminen, painon lasku, vähäinen turkin puhtaana pito, vaikea ääntely käsiteltäessä) n. viikon toipumisjakson aikana. 72 %:lle hankkeen eläimistä haitta luokiteltiin vakavaksi aivokuorivaurion takia. Loput hankkeen eläimistä (28 %) altistuivat enintään kohtalaiselle haitalle, ja ne käytettiin mm. kirurgiseen harjoitteluun terminaalianestesiassa tai magneettikuvausmenetelmän optimointiin, tai eläimet liikkuivat liikaa perustason magneettikuvauksen aikana, jonka vuoksi ne jouduttiin hylkäämään varsinaisesta tutkimuksesta.

Alustavan arviomme mukaan hankkeessa käytetyn vakavan tautimallin seurauksena n. 30 % rotista menehtyy tai täyttää lopetuskriteerit pian leikkauksen jälkeen. Todellisuudessa 10.7 % eläimistä, joille aivokuorivaurio tehtiin, kuoli operaatioon tai pian sen jälkeen, ja 19.4 % eläimistä lopetettiin pian aivokuorivaurion jälkeen lopetuskriteerien vuoksi (yleensä liian suuri painon lasku tai magneettikuvista varmennettu epäonnistunut aivokuorivaurio). Yhteenlaskettu 30.1 %:n menetys tutkittavista rotista oli siis erittäin lähellä arviotamme (30 %). Voimme siis todeta, että aivokuorivaurioon liittyvät toimenpiteet onnistuivat eläinten kokeman haitan kannalta oletetusti. Mikäli eläimet selvisivät toipumisjakson yli, ne kuntoutuivat pääasiassa hyvin ja olivat ulkoisesti hyvinvoivan ja normaalin oloisia, eikä niitä tarvinnut lopettaa seurantakuukausien aikana.

Hankkeen alkuperäinen suunnitelma oli toteuttaa magneettitutkimukset hereillä olevilla rotilla, joista katsottiin aiheutuvan rotille lievää-kohtalaista haittaa. Kuten tämän lomakkeen kohdassa 1 on jo mainittu, tutkimusteknisistä syistä vaihdoimme menetelmän kevyesti nukutetuilla rotilla tehtävään magneettikuvaukseen, joka pienentää eläinten kokeman haitan aikaisemman kokemuksemme mukaan lievälle tasolle. Tutkimusteknillisten muutosten takia emme siis pysty kommentoimaan kokemuksiamme hereillä olevien päätraumaeläinten kuvauksista, kuten takautuvassa arvioinnissa oli pyydetty. Voimme kuitenkin todeta, että magneettitutkimukset kevyesti nukutetuilla traumaeläimillä sujuivat hyvin. Eläinten paino putosi odotetusti muutamia grammoja parin ensimmäisen koulutuspäivän aikana, jonka jälkeen painonkehitys normalisoitui. Positiivisena kannustimena annostellut suklaamurot kelpasivat rotille erittäin hyvin, ja moni rotista selvästi odotti murojen saantia tutkimuksen aikana. Muroja annettiin aina magneettitutkimusta ja siihen liittyvää koulutusta ennen ja jälkeen. Eläimet olivat helppoja käsitellä, ystävällisiä ja leikkisiä, ja tulivat omaaloitteisesti kouluttajan luo ja syliin. Vaikka rotille oli aiheutettu aivokuorivaurio ja niitä oli koulutettu magneettitutkimukseen, ei niissä esiintynyt arkuutta, pelokkuutta, aggressiivisuutta, tai puremista. Aivokuorivaurion jälkeen rottien päälaki oli odotetusti arka, ja magneettitutkimuksessa käyretty vastaanotinkela aseteltiin varoen rotan pään päälle jotta rotalle ei aiheutuisi ylimääräistä kipua. Muihin fysiologisiin havaintoihin liittyen, huomasimme ensimmäisinä koulutuspäivinä rottien lisääntyneen ulostusaktiivisuuden koulutuksen aikana, joka viittaa mahdollisesti stressireaktioon. Olemme huomanneet tätä myös aikaisemmin muissa projekteissa. Myöhemmin koulutuspäivinä tätä ei kuitenkaan havaittu, joka yhdessä muiden tekijöiden kanssa viittaa siihen, että rotat tottuivat kuvaukseen hyvin. Yhtenä tämän projektin yllätyksenä huomasimme, että osa rotista eritti porfyriinia koulutushetkien aikana. Tätä emme aikaisemmin ole selvästi havainneet. Asiasta

konsultoitiin eläinlääkäriä, joka totesi sen liittyvän normaalisti stressireaktioon. Koska pian aivo-kuorivaurion jälkeen rottien turkinhoito on heikentynyt, tutkijat putsasivat joissakin tapauksissa eläinten silmänalusia kuivuneesta porfyriinista. Lautakunta oli edellyttänyt vastaamaan takautuvassa arvioinnissa myös erityisesti kysymykseen ”Miten usein kuvantamisen aikana esiintyi vakavia epileptiakohtauksia?”. Tähän voimme todeta, että epileptisiä kohtauksia ei havaittu kertaakaan kuvausten aikana, joka todennäköisesti johtuu siitä, että jo pieni määrä inhalaatioanesteettia, joka kevyesti nukutetuille eläimille annostellaan, voi vaimentaa magneettitutkimuksen aikaiset epileptiset kohtaukset (Fukuda et al. 2013). Yhteenvedon voidaan todeta, että eläinten kokema haitta magneettitutkimusten näkökulmasta oli tosiasiallisesti merkittävästi matalampi kuin mitä alkupe- räisessä hankkeessa oli arvioitu.

Tässä tutkimuksessa otimme käyttöön, ensimmäistä kertaa yliopistomme tasolla, rottien välisei- nälliset ja kaksikerroksiset kaksoishäkit. Häkkien merkityksestä rottien hyvinvoinnille on vaikea ve- tää selkeitä johtopäätöksiä, mutta on perusteltua olettaa, että rotat viihtyivät häkissään paremmin sosiaalisen kontaktin vuoksi. Esimerkiksi, kun kuvauksen jälkeen parihäkkiin tuotiin häkkikump- pani, joka vielä hieman toipui anestesiasta, oli häkissä oleva toinen rotta selvästi kiinnostunut häk- kitoveristaan, sekä viereiseen häkkiin annostelluista suklaamuroista. Nämä tekijät viittaavat siihen, että tuplahäkit mahdollistavat monipuolisemman ympäristön rotille yksittäishäkkeihin verrattuna. Tuplahäkkien kaksikerroksisuudessa havaittiin kuitenkin pieni ongelma. Kun nukutettu rotta ase- tettiin häkin pohjakerrokseen, kiipesi se monesti heti herättyään toiseen kerrokseen, mutta kaatui sieltä alas ensimmäiseen kerrokseen koska oli vielä tokkurassa nukutusaineen vaikutuksen takia. Eli vaikka häkkien kaksi kerrosta mahdollistaa rotalle virikkeellisemmän ympäristön, voi se joissain tapauksissa olla rotalle hieman haitallinen ympäristö. Yksikerroksisessa häkissä tätä ongelmaa ei luonnollisesti ole.

Hankkeen muut toimenpiteet, kuten aivosähkökäyrän mittaus, käyttäytymistestit, ja nukutuksessa tehtävä positroniemissiotomografia, toteutettiin suunnitellusti, ja näistä arvioitu haitta rotalle oli myös tosiasiallisesti lievä. Muutamat rotat olivat käyttäytymistestien aikana hieman jännittyneitä ja arkoja, ja pyrkivät tutkijan syliin niiden aikana. Tämä oli odotettua aikaisemman kokemuk- semme perusteella, ja oletamme tämän johtuvan aivokuorivauriosta, joka oli aiheutettu rotalle muutamaa päivää aiemmin. Aivosähkökäyrämittausten aikana vain yhdeltä rotalta irtosi implantti spontaanisti. Lisäksi kahdelta rotalta implantti irtosi tutkijan/eläinlääkärin käsittelyn aikana. Kokonaisuuteen nähden implanttien irtoaminen oli siis erittäin vähäistä.

3. 3R-mahdollisuudet

Tavoitteena on kehittää MRI-menetelmiä koko aivot kattavaan tutkimukseen, jotka olisivat suo- raan sovellettavissa kliiniseen käyttöön, ja tällöin tietokonesimulaatiot tai solu/leiketutkimukset eivät pysty tarjoamaan vaihtoehtoa. Koska ihmiskokeet eivät tule kyseeseen, emme valitettavasti näe vaihtoehtoista tapaa toteuttaa kyseistä tutkimusta.

1) Eläinten määrän vähentäminen

Tutkimusryhmämme on osoittanut, että nukutusaineet vaikuttavat suuresti aivojen verkostoraken- teiden havaitsemiseen. Käyttämällä hereillä olevia tai vain kevyesti nukutettuja eläimiä nukutusai- neiden haittavaikutukset voidaan minimoida. Mitä nopeammin tutkijat siirtyvät käyttämään enin- tään kevyesti nukutettuja eläimiä, sitä nopeammin eläinkokeissa saavutetut tulokset ovat parem- min toistettavia ja vertailtavissa ihmiseen. Isossa kuvassa tämä merkitsee vähemmän eläinkokeita, kun aikaisempia nukutetuilla eläimillä saavutettuja tuloksia ei tarvitse varmentaa erikseen hereillä olevilla eläimillä, jotta voidaan poissulkea nukutusaineiden mahdolliset vaikutukset tuloksiin.

Lisäksi hereillä olevat tai kevyesti nukutetut rotat voidaan mitata useamman kerran, joka vähentää eläinmäärää merkittävästi verrattuna esim. terminaalianestesiassa tehtäviin tutkimuksiin.

Aivokuorivauriomallin tekninen onnistuminen on kohta, jota optimoimalla kokonaiseläinmäärää voi teoriassa alentaa. Pienempi hajonta yksilöiden välillä ja matalampi kuolleisuus vaikuttaisivat suoraan tarvittavaan eläinmäärään positiivisesti. Käytännössä malli on kuitenkin haastava toteuttaa täsmälleen samalla tapaa jokaiselle eläimelle, ja käytännön toteutus harjaantuukin kokemuksen karttuessa operaation suorittavalla henkilöllä.

Hankeessamme kerättiin valtava määrä aineistoa useilla eri menetelmillä (magneettikuvaus, positiivisotomografia, aivosähkökäyrä, ja käyttäytymiskokeet), ja arvioimme että hankkeeseen käytetyt rotat hyödynnettiin erittäin hyvin, joka vähentää kokonaiseläinmäärää isossa kuvassa.

2) Hyvinvoinnin parantaminen

Rotat olivat tässä hankkeessa alusta alkaen korkeissa parihäkeissä, joka sallii sosiaalista vuorovaikutusta häkkikaverin kanssa. Tyypillisesti rottia on pidetty tällaisissa tutkimuksissa omissa häkeissä rottien turvallisuuden vuoksi (esim. epileptiset kohtaukset ja heikkokuntoinen rotta vs. parempikuntoinen rotta yhdistettynä aggressiiviseen käyttäytymiseen tai vastakkainasetteluun). Kaksihäkeissä rotat mahtuvat seisomaan häkeissään, liikkumaan kahden eri kerroksen välillä ja vuorovaikuttamaan häkkikaverin kanssa reiällisen väliseinän lävitse. Nämä tekijät oletettavasti parantavat rottien hyvinvointia.

Aivokuorivaurion aiheuttamisen jälkeen rottia seurattiin tiiviisti sekä tutkijoiden että eläintenhoitajien toimesta (myös viikonloppuisin). Kipulääkkeitä, nesteytys, ja tarvittaessa puuomainen ruoka annosteltiin säännöllisesti, jotta rottien palautuminen olisi mahdollisimman nopeaa ja tehokasta. Suurin osa rotista toipui hyvin. Rotilla oli riittävä aika palautua aivokuorivaurion jälkeen ennen kevyesti nukutettuina tehtyjä mittauksia. Inhimillisten lopetuskriteerien tiukentaminen ei näkemyksemme mukaan lisää rottien hyvinvointia merkittävästi aivokuorivaurion jälkeen. Esim. painon lasku >20 % on vain 1-3 päivää kestävä tila ja erittäin yleistä kyseisessä mallissa. Mikäli rajaa tiukennettaisiin esim. 20 %:iin, niin suuri osa rotista jouduttaisiin lopettamaan vain muutaman päivän painovajeen takia, ja lisäksi hankkeeseen kohdennettu eläinmäärä jouduttaisiin moninkertaistamaan, mikä ei ole kokonaiskuvassa järkevää. Lisäksi rotilla on vahva kipulääkitys ensimmäisen päivien ajan, jolloin niiden kokemaa haittaa on pienennetty merkittävästi.

Kevyesti nukutettujen rottien magneettikuvauksessa rotille annettiin positiivinen kannustin (suklaamuroja) ennen ja jälkeen toimenpiteen. Rotat aseteltiin huolellisesti pehmustettuun kuvaustelineeseen, ja esteetön hengitys varmistettiin. Vesikiertoinen lämmitys piti eläintelineen lämpimänä kuvausten ajan. Rotat totutettiin suunnitelman mukaan asteittain mittaukseen, joka minimoi rottien kokeman stressin. Rottien silmille asetettiin silmägeeliä kuivumisen estämiseksi. Lisäksi kevyesti nukutetuilla rotilla koulutuskertoja tarvitaan vähemmän kuin täysin hereillä olevilla rotilla, jolloin rottien kokema kokonaishaitta pieneni. Yleisesti ottaen, rottien hyvinvointiin magneettitutkimusten aikana kiinnitettiin paljon huomiota, sillä rotan kokemat epämukavuudet esiintyvät kokemuksemme mukaan lisääntyneenä liikkeenä, joka on haitallista kuvauksen onnistumisen kannalta.

Hereillä olevien eläinten kuvaustekniikoita on mahdollista kehittää edelleen. Ryhmämme tekee jatkuvasti kehitystyötä esim. päästä kiinnitettyjen rottien kuvantamisen parissa, joka onnistuessaan mahdollistaa entistä stressittömämmän kuvausmenetelmän rotille.

Taulukko 1. Eläimille aiheutettu haitta, eläinten käyttömäärät ja 3R-soveltaminen

Tiedot on annettava koko hankkeen osalta. Listaa taulukkoon osahankkeet ja/tai toimenpiteet, kerro eläinten käyttömäärät eri vakavuusluokissa sekä käytetyt 3R-keinot. Jatka taulukkoa tarvittaessa. Taulukko julkaistaan hankkeen yleistajuisessa tiivistelmässä. Katso vakavuusluokittelun kriteerit: asetus 564/2013 Liite 3.

Osahanke / Toimenpide	Eläinlaji	Tavoitteet saavuttaminen (+ / -)	Eläinmäärä: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Vakavuusluokka: Luvassa arvioitu / tosiasiallinen	Millaista vakavin haitta oli?	3R-keinot: miten eläinmääriä on voitu vähentää tai eläinten hyvinvointia parantaa?
Hereillä olevilla rotilla tehtävä toiminnallinen magneettikuvantaminen traumamallissa	Rotta, Sprague-Dawley	+	152 / 147	Vakava / Vakava (72 %), enintään Kohtalainen (28 %).	Vakavin haitta, aivokuorivaurio, oli odotettua ja tautimallista aiheutuvaa.	Aivotutkimukset tajuisilla eläimillä tuottavat luotettavampaa tutkimusaineistoa, ja vertautuvat paremmin ihmiseen. Näin ollen eläinkokeiden kokonaismäärä on pienempi. Samoista eläimistä kerättiin tietoa usealla eri menetelmällä, maksimoiden yksittäisen eläimen arvo. Eläimet olivat koko tutkimuksen ajan normaalia paremmissa häikeissä, joka edesauttoi eläinten viihtyvyyttä. Aivokuorivaurion jälkeen eläimiä hoidettiin huolellisesti päivittäin. Lisäksi magneettitutkimukset tehtiin kevyessä nukutuksessa, jotta eläinten kokema stressi saatiin minimoitua.

Taulukko 2. Tiedon tehokas jakaminen 3R-keinoista: listaa käyttämäsi 3R-keinot ja pohdi, millä laajuudella keinoja voisi hyödyntää. ESAVI kerää taulukon avulla tietoa 3R-keinoista, joita voisi hyödyntää hankelupalautakunnan toiminnassa tai laajemmin.

Käytetty 3R-keino (alla esimerkkejä)	Hankeessa sovellettava	Omassa toiminnassa sovellettava	Yleisesti sovellettava	Julkaistaan tuloksia raportoitaessa
Kaksikerroksiset parihäkit	x	x		x
Kevyesti nukutettujen rottien magneettitutkimus, asteittainen totuttaminen	x	x	x	x
Monipuoliset tutkimusmenetelmät jokaiselle rotalle	x	x	x	x
Huolellinen seuranta ja hoito aivokuorivaurion jälkeen (punnitus kahdesti päivässä, erityisruokinta, kipulääkitys)	x	x	x	x